

AG

*** NOTICES ***

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

Freeze-dried stable physic pharmaceutical preparation of a monoclonal antibody or a polyclonal antibody This invention relates to the physic pharmaceutical preparation with which the monoclonal which contains sugar or aminosugar, amino acid, and a surfactant as a stabilizer, or the polyclonal antibody was freeze-dried. Furthermore, this invention relates to use of the sugar as a stabilizer of the therapy agent which contains an antibody in these stable pharmaceutical preparation approaches of a freeze-drying object, and a list, or a diagnostic agent or aminosugar, amino acid, and a surfactant. Manufacture of the immunoglobulin for a therapy and the diagnostic purpose especially a monoclonal antibody, and a polyclonal antibody is very important today, and importance is increasing continuously.

Use of the antibody as medical pharmaceutical preparation is already known for a long time, and has many applications. Therefore, the antibody has been used with a good result, in order to fight with a pathogenic microorganism, or in order to neutralize those toxins for prevention of tetanus, and in order to fight with poisoning by snake venom further.

if the antigen relevant to a sick mechanism is identified, in the case of many infectious diseases and some cancers, this will come out so, but the singularity of an antibody is used for a therapy.

In clinical and front clinical research, since an antibody affects angiotensin / renin system in order to make cholesterol level fall today, it is used in an autoimmune disease, for example, lupus, autoimmunity nature encephalitis, multiple sclerosis, polyarthritis, and autoimmunity myasthenia.

Furthermore, main therapy-importance is those use for opposing poisoning by the low-molecular-weight matter like the Fab fragment of an anti-digoxin antibody, when used for poisoning by digoxin or cardiotonic glycoside digitonin, and ouabain.

Furthermore, an antibody is used in the diagnostic field for identifying proteinic contents, and refining and measuring.

The gene engineering in the second half of the 1970s and the 1980s which started a

revolution called production of the monoclonal antibody in bacterial culture greatly developed manufacture of an antibody.

In order to fulfill such various applications, it is important during storage to gain the physico-pharmaceutical preparation of a stable monoclonal antibody and a polyclonal antibody. Many publications about the specific liquid pharmaceutical preparation and the specific freeze-drying object of an antibody exist. That is, for example, the liquid pharmaceutical preparation of an antibody is indicated by EP 0, 280 and 358, EP 0, 170 and 983, WO 89/11298, EP 0,352,500, and JP,63-088197,A.

According to EP 0,280,358, in order to stabilize an antibody solution to a certain kind of hormone, the dextran was added by the antibody solution, and thereby, the stabilization to [in nine months] was able to be attained. When it heats, in order to stabilize the monoclonal antibody which is heat sensitivity according to EP 0,170,987, the hydrolyzed ovalbumin was added, and after storing an antibody for seven days at 45 degrees C, as a result, in addition, it was usable. Polyhydroxy alcohol (for example, glycerol, an inositol, polyvinyl alcohol), sugar (for example, sucrose and a glucose), or glycitol (for example, a sorbitol, a mannitol) is known as further stabilizer for liquid pharmaceutical preparation from JP,63-088197,A. WO 89/11298 shows use of the maltose in the inside of the phosphate buffer solution which contains a sodium chloride as further approach for liquid stabilization of a monoclonal antibody. EP 0,352,500 have indicated the polyethylene glycol 4000 and 3-propiolactone for solution stabilization of a monoclonal antibody.

However, generally liquid pharmaceutical preparation is not the solution optimal for storage stability. Because, when protein or its floc is conveyed through a different climatic zone in an elevated temperature, by unsuitable storage (for example, interruption of cooling), it precipitates with time amount during storage, and, so, a solution has the lowered protein content, and it will become muddy. Therefore, the solution which is satisfactory in these cases must have been guaranteed.

On the other hand, in the case of lyophilized products, removal of water makes min generation (for example, based on deamidation and hydrolysis) of a decomposition product, and formation of floc. Especially a moisture residue (bound water) can be contributed to stability under existence of sugar (Hsu et al., Der.Biol.Stand.1991, 74:255-267; and Pikal et al., Der.Biol.Stand.1991, 74:21-27).

Although the freeze-drying object which contains a specific antibody as an active substance is known from reference, these do not offer the advice which was consistent to the problem of stabilization. That is, stabilizing a monoclonal antibody and a polyclonal antibody further in a living thing ingredient, for example, Homo sapiens protein, growth hormones, interleukin, and an enzyme list by the two-component system which changes from a cooling protective coat (for example, polyethylene glycol) and protein, and the compound that can form a hydrogen bridge to WO 93/00807 is indicated. However, the fault of these pharmaceutical preparation is that addition of the high molecular compound like a polyethylene glycol is potentially

accumulated in the inside of the body with a toxic side effect, if biodegradation does not arise. Furthermore, a polymer may work as an antigen like common knowledge depending on the molar quantity.

According to the application public presentation 60-146833, the freeze-drying object of a monoclonal antibody unstable in the case of freezing is stabilized by addition of albumin (albumin of Homo sapiens, a horse, or a cow) for one year. The human serum albumin (HSA) is indicated by EP 0,303,088 again in combination with a carbohydrate (for example, glucose, sucrose or a maltose), in order to stabilize the monoclonal antibody for the therapy of infection of Pseudomonas aeruginosa.

A human serum albumin (setting about combination with sugar and amino acid) is a principle to stabilize a monoclonal antibody in EP 0,413,188 again. In JP,1-075,433,A, a human serum albumin, a mannitol, and polyethylene-glycol mixture are used in order to stabilize the Homo sapiens monoclonal antibody as a freeze-drying object. Use of the giant molecule like a polyethylene glycol for stabilization of the gamma globulin under freeze drying and the protection protein like a human serum albumin is shown in WO 84/00890.

Stabilization of the Homo sapiens monoclonal antibody by freeze drying using the mannitol in a solution and glycine containing a sodium chloride and a phosphate buffer solution is indicated by Hagiwara's and others WO 93/01835. Pharmaceutical preparation stable about freezing, freeze drying, and reconstruction is obtained.

Draber and others (J. Immun.Methods, 1995, 181:37-43) -- addition of only trehalose -- or in combination with a polyethylene glycol 8,000, the stable pharmaceutical preparation of the monoclonal IgM antibody from a mouse was able to be manufactured at 4 degrees C. However, the antibody was stable for only 14 days at 50 degrees C. It was impossible to have stabilized these antibodies only using other mono-saccharide or DISACCHARIDES, for example, sucrose, maltoses, lactoses, or galactoses.

In WO 89/11297, the monoclonal antibody from a mouse is converted into a stable freeze-drying object using a carbohydrate (maltose) and the buffer solution (acetic-acid buffer solution) in an acid field. In this case, a fault is limitation to buffer-izing of an acid field.

In WO 92/15,331, giant-molecule gelatin is used as the cryoprotective agent and stabilizer in a freeze-drying object. Stabilization is attained again also in the combination of a carboxylic acid (for example, citric acid) or its salt, and the first class, the second class, the third class alcohol or amino acid in the pH range of 6.8-8.1.

In all the aforementioned publications, the physico-additive or assistant matter which is not permitted from a medical viewpoint is proposed as a stabilizer. That is, a polymer (for example, PEG or gelatin) and protein (for example, serum albumin) may carry out risk of a certain kind by those origins and physicochemical properties, and may start an allergic response to the point of an ANAPHYLACTIC shock. The protein obtained from the protein and the cell culture of Homo sapiens or the animal origin has the risk

of virus contamination. However, other protein Mr. contamination with it difficult [to detect analytically] may produce an immunoreaction in Homo sapiens for the property.

For example, addition of the high polymer like a polyethylene glycol (PEG) or gelatin may be potentially accumulated in the inside of the body with a toxic side effect, if there is no biodegradation. A polymer has an antigen property again depending on the molecular weight. Furthermore, it is difficult to guarantee the purity of a polymer for the existence of the catalyst used during manufacture or a monomer, and other polymer fragments. If stabilization of other types is possible, use of the polymer in a physic administration form, especially the physic form which can be administered hypodermically should be avoided.

On the other hand, when an antibody is freeze-dried, use of only sugar without other additives does not necessarily guarantee an always suitable protective effect.

Therefore, the purpose of this invention is offering the stable physic pharmaceutical preparation of the monoclonal antibody which does not contain substantially the aforementioned polymer or a protein nature physic assistant, or a polyclonal antibody. This is especially applied to the antibody of susceptibility to freezing and defrosting of 1 time or multiple times.

It was found out by making a surprising thing contain sugar or aminosugar, amino acid, and a surfactant as an additive that the stable physic freeze-drying object of a monoclonal antibody or a polyclonal antibody is obtained. This freeze-drying object is a preferably.

It consists of the buffers and e surfactants for adjusting an antibody, b sugar or aminosugar, c amino acid, and d pH value. Especially the freeze-drying object only containing a single or two kinds of different amino acid is desirable.

These preparation objects can be borne well physiologically, and have a comparatively simple presentation, and may be correctly prescribed for the patient. Furthermore, these are stable. That is, these do not show a detectable decomposition product or detectable protein **** to a list in the long storage time, when applied to many freezings and defrosting. without this freeze-drying object is accompanied by the problem of stability -- refrigerator temperature (4-12 degrees C) -- setting -- whenever [or / room temperature] -- (18-23 degrees C) even setting -- at least three months -- desirable -- at least six months -- and it can store over one - two years especially. Furthermore, these are elevated temperatures (up to 30 degrees C) more again.

It is stable also when set [it was alike and] and stored. Storage stability is shown by by detecting a small number of particle very much throughout [storage term / of the above] when for example, a freeze-drying object is reconfigured with water for injection or an isotonic solution in a container. Especially a container ***** 600 particles with bigger less than 6000 pieces and/or grain size than 25 micrometers for a particle with a bigger grain size than 10 micrometers. In this way, the prepared solution is preferably [in about five days] stable in three days.

It is especially advantageous that a preparation object protects to freezing for the combination as which the additive was chosen. That is, especially this enables freeze drying in the temperature to -45 degrees C, without spoiling the stability of an antibody. Furthermore, the freeze-drying object which changes including the combination of the additive of this invention is comparatively stable during storage over a long period of time even in an elevated temperature. Compared with the conventional pharmaceutical preparation, they do not show formation of a particle after reconstruction by water especially. That is, a solution hardly has muddiness.

The preparation object of this invention does not contain on parenchyma the protein or the macromolecule adjuvant with which a problem has a medical viewpoint in use. These have the advantage of addition that a medicine may be prescribed for the patient without being substantially accompanied by the pain, by the ability bearing well for the fact that the therapy agent or diagnostic agent containing about five to 8 pH value and the antibody which has the pH value (the pH value of blood is 7.2-7.4) of 6.0-7.0 preferably of a liquid is obtained by the dissolution of a freeze-drying object. Especially this is important because of subcutaneous administration. It is because subcutaneous administration produces the pain which cannot be borne compared with vein administration.

Generally the pharmaceutical preparation of this invention can be preferably manufactured by the concentration to 10mg/ml to the density range/ml of an antibody which is clinically meaningful, for example, 20mg. 0.01mg /or more especially of desirable density ranges is [ml] 0.05 and 0.1mg/ml or more. Especially, 0.05-10mg [ml]/, 0.1-5mg [ml], 5 and 8, /, or a 10mg [/ml] density range is used. [for example,] In the case of, in the case of subcutaneous injection or an intravenous injection, it is less than 2ml, and the injection volume of the solution used is about 1ml preferably. Since the small injection volume gives only a slight stimulus especially to subcutaneous tissue, its subcutaneous administration is desirable. Fundamentally, the solution is directly suitable also as an additive of an impregnation solution as an impregnation solution again. When these are used as an additive of an impregnation solution, it is high level by the concentration of an antibody, for example, is to 10mg/ml. It is added by the impregnation solution of daily use next, and let these concentrated solutions of an antibody be the range which is meaningful as antibody concentration physic in the impregnation solution which should be prescribed for the patient by this. This range is usually 0.001-0.5mg/ml.

Unit administration form physic may exist as the impregnation solution which can be used immediately, an injection solution, or a freeze-drying object. When physic pharmaceutical preparation is used in the form of a freeze-drying object, a unit administration container, for example, the glass ampul of 10ml volume, contains preferably 0.1-500mg of 10-100mg antibodies depending on the dose which is meaningful as each physic of an antibody. In arbitration, a freeze-drying object contains the physic excipient of additional daily use. It can dissolve in a suitable

quantity of a reconstruction solution, and then a freeze-drying object can be directly used as an injection solution, or can be used as an additive of an impregnation solution. When used as an additive of an impregnation solution, it usually dissolves with about 10ml reconstruction solution, and a freeze-drying object is added by 250ml physiological sodium chloride solution (0.9% NaCl). A patient is medicated with the impregnation solution obtained within about 30 minutes next.

The sugar used according to this invention can be a mono-saccharide, JISAKKARAI DO, or TORISAKKARAI DO. A glucose, a mannose, a galactose, fructose, and a sorbose are taken into consideration as a mono-saccharide. Shoe cloth, a lactose, a maltose, or trehalose is taken into consideration as JISAKKARAI DO. A raffinose is suitably used as TORISAKKARAI DO. According to this invention, shoe cloth, a lactose, a maltose, a raffinose, or trehalose is used especially suitably. The cellobiose, the gentiobiose, or isomaltose which is JISAKKARAI DO of a stereoisomer instead of can also be used. [a maltose]

Generally the mono-saccharide which has an amino group (-NH₂, -NHR, -NR₂) or the acylated amino group (-NH-CO-R) instead of hydroxyl is called aminosugar, and is used. According to this invention, for this reason, a glucosamine, N-methyl glucosamine, galactosamine, and especially a NYURAMIN acid (neuraminic acid) are desirable. A sugar content or an amino content is to 800 or 500mg especially preferably [it is desirable to per unit administration form (for example, 2000mg), and] to 1000mg. As a minimum of a sugar content, 10, 50, or 100mg or more are taken into consideration, for example. Especially the desirable range of 200-1000mg is 400-800mg.

The above-mentioned amount per unit administration form is related with the unit administration form marketed as a freeze-drying object. An injection bottle with a capacity of 10ml is preferably filled up with such a freeze-drying object. After dissolving a freeze-drying object with a 10ml reconstruction solution, the liquid administration form which can be directly prescribed for the patient is acquired. The sugar concentration in these injection solutions is to 100mg/ml preferably to 200mg/ml based on the above-mentioned amount of the sugar used.

The amino acid used according to this invention can be a basic amino acid, for example, an arginine, a lysine, a histidine, an ornithine, etc., and amino acid is preferably used in the form of the mineral salt (as the form which is phosphate preferably, i.e., phosphoric-acid amino acid). When a free amino acid is used, a desirable pH value is adjusted by addition of the suitable buffer substance permitted physiologically, for example, an inorganic acid, a phosphoric acid, a sulfuric acid, an acetic acid, formic acid, or these salts. In this case, use of phosphate is advantageous at especially the point that a stable freeze-drying object is obtained especially. It is especially advantageous when the anions (malic-acid ion, tartaric-acid ion, citric-acid ion, succinic-acid ion, fumaric-acid ion, etc.) with which a preparation object does not contain substantially an organic acid, for example, a malic acid, a tartaric acid, a citric

acid, a succinic acid, a fumaric acid, etc. and which case [anions] or correspond do not exist.

Desirable amino acid is an arginine, a lysine, or an ornithine. Furthermore, acidic amino acid, for example, glutamic acid, and an aspartic acid or neutral amino acid, for example, an isoleucine, a leucine and an alanine or aromatic amino acid, for example, a phenylalanine, a thyrasin, or a tryptophan can also be used. The amino acid content in the aquosity preparation object of this invention is to 30mg/ml to 50mg/ml preferably to 100mg/ml. A minimum is 10mg/ml or more in 1, 5, or concentration. Desirable concentration is the range of 3-30mg [ml] /or 10-25mg/ml. When the administration form where it corresponds is sold as a freeze-drying object, these freeze-drying objects are preferably obtained in the bottle for injection (capacity is 10ml). Such a unit administration form contains amino acid in the amount to 300mg to 500mg preferably to 1000mg.

all the surface active agents with which the surface active agent taken into consideration is usually used into physic pharmaceutical preparation -- they are polysorbate and a polyoxyethylene-polyoxypropylene copolymer (R), for example, Tween, preferably. ml, in order that the little surfactant of 0.1mg/ml 0.05-0.5mg /may stabilize an antibody preferably, it is enough. In the case of the freeze-drying object with which a 10ml injection bottle is filled up, in the above-mentioned unit administration form, the amount of a surfactant is 0.5-5mg.

Theoretically, stabilization of the antibody attained with the aforementioned additive is related with those Fab fragments at all known monoclonal antibodies and polyclonal antibody lists. A hominization antibody and the embellished antibody (for example, refer to United States patent No.5,624,821;EP 0,592,106 ;P [96/00098] CT/EP) are used suitably. The molecular weight of an antibody is 50kDa-200kDa per molecule unit, and especially molecular weight is about 80 to 150 kDa. Especially A hepatitis B virus (refer to WO 94/11494), An AIDS virus, a cytomegalovirus, a meningoencephalitis virus (FSME), A German measles (rubella) virus, a HASHIKA (measles) virus, A rabies pathogen, the Pseudomonas aeruginosa bacteria, a varicella-band-like **** virus, A tetanus pathogen, a fan buoy RUBURANTO factor (van Willebrandt factor) (refer to WO 96/17078), NGFR (nerve growth factor acceptor), PDGFR (platelet derived growth factor; Shulman, Sauer, Jackman, Chang, Landolfi, J.Biol.Chem., 1997, 272 (28):17400-4), and selectin -- especially -- E-selectin -- L-selectin (refer to Takashi et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1990, and 87;2244-2288;WO 94/12215) or P-selectin; Integrin, Or the antibody to a diphtheria pathogen can be stabilized according to this invention. Antibody concentration can be to 8mg/ml preferably. For example, ml is desirable in 0.05-2mg /. The amount of the antibody in the freeze-drying object in a unit administration form, for example, a 10ml injection bottle, is to 80mg, 50mg, 20mg, or 10mg preferably to 100mg. 1-10mg /of concentration of the antibody after reconfiguring a freeze-drying object with the capacity of 10ml is [ml] the range of 5-8mg/ml preferably.

In addition to addition, i.e., sugar, aforementioned amino acid, and an aforementioned surfactant, the freeze-drying object of this invention can contain the adjuvant which was chosen from the group which consists a pH value of the acid 5-8, and for adjusting to 6.0-7.4 preferably, a base, a buffer, or an isotonicity agent and which is permitted physiologically. When a freeze-drying object is dissolved by the standard reconstruction solution like water for injection, the buffer capacity of the preparation object of this invention is adjusted so that the concentration of the buffer solution may become the range of about 15 mmol/L preferably ten to 20 mmol/L.

It is greatly dependent on the manufacture approach, and various adjuvants or the addition sequence of an antibody is left to decision of this contractor. The pH value of a request of a solution is adjusted by addition of for example, hydroxylation alkali, an alkaline earth hydroxide, or an aluminum hydroxide. For this reason, a sodium hydroxide is used preferably. A desired pH value is adjusted by addition of a basic solution in principle. Generally in this semantics, the salt of weak acid and a strong base, for example, sodium acetate, a sodium citrate, sodium diphosphate, the first sodium phosphate, or a sodium carbonate is desirable. When the physic solution of an adjuvant has a basic pH value, this thing is adjusted by titration until it reaches a desired pH value. For example, the inorganic or organic acid like the solution of daily use of the matter which has a hydrochloric acid, a phosphoric acid, an acetic acid, a citric acid, or an acid pH value permitted as physic is taken into consideration. In this semantics, the desirable matter is the salt of the weak base and strong acid like a sodium dihydrogenphosphate or disodium hydrogenphosphate. The pH value of a solution is preferably adjusted by a phosphoric acid or the sodium-hydroxide water solution.

an antibody -- and -- constant -- a law -- when isosmotic must have been attained depending on the osmotic-pressure nature of the additive used for-izing, in order to manufacture non-***** permitted well, the tonicity adjustment **** matter is added. The nonionic adjuvant which for that is permitted well first is used. However, a small amount of salt, for example, a sodium chloride, can be added in the range in which the last concentration in the parenteral solution for administration or infusion does not exceed 30 mmol/L.

Furthermore, physic pharmaceutical preparation can contain the further common adjuvant or the further common additive. An anti-oxidant, for example, a glutathione, an ascorbic acid, or the similar matter can be added.

In order to manufacture a freeze-drying object, the physic water solution which contains an antibody first is manufactured. The buffer-ized antibody solution which contains a sodium chloride preferably is prepared. This antibody solution is mixed with the water solution containing the sugar, amino acid, and surfactant which are an additive, and a pH value is adjusted to 5-8 by an acid or the base in the meantime. A phosphoric acid or phosphate, and a sodium chloride are added so that the concentration determined beforehand may be obtained. Next, filtration disinfects and

the solution prepared in this way is freeze-dried.

This invention makes it possible to change into a stable preparation object, without spoiling quality for the unstable water solution which contains the antibody of susceptibility to freezing in an elevated temperature with the means of freeze drying again.

It the further advantage of the freeze-drying object of this invention not only avoids the damage over the antibody under freezing, but is that after storage of a 50-degree C long period of time does not show reduction of the amount of antibodies, and generation of condensation. Formation of the particle shown with the low value of muddiness after reconstruction of the freeze-drying object by water for injection is avoided.

Application of the following example explains this invention to a detail further.

Examples 1-10 pharmaceutical-preparation-ize the freeze-drying object of this invention, manufacture it, and show the mode examined about the stability of an antibody.

Or an adjuvant is not included, only shoe cloth is included, a mannitol is included as an alternative of a sugar component, and only an amino acid component is included, in order to attain stable pharmaceutical preparation, according to the place which the comparative experiments in which only an amino acid component contains only sugar excluding a surfactant show, selection of the additive according to this invention is indispensable. Only shoe cloth brings about pharmaceutical preparation with both the unstable components on which only amino acid does not follow a surfactant.

To freezing, the pharmaceutical preparation of this invention is non-susceptibility, and can eliminate completely the polymer or protein considered that there is toxicity like a polyethylene glycol, gelatin, and serum albumin. In the case of a surfactant, the comparatively little surfactant permitted physiologically exists.

The antibody to HBV used in the following example is a recombination Homo sapiens monoclonal antibody (MAB) of the cell origin of a rat. This has the molecular weight of about 147 kDa(s), and is turned to the hepatitis B surface antigen (HBsAg) of a hepatitis B virus. This monoclonal antibody recognizes a-determinant of fixed HBsAg in the variant of almost all known of this virus. This antibody is the therapy of the chronic hepatitis in which the therapy approach which should be satisfied conventionally [of the following physic application / :] which can be used for accumulating did not exist, and a passive immunity prevention therapy in a HBsAg-positivity transplantation patient.

In the U.S., 2% of population is the carrier of a hepatitis B virus at central Europe and the North Europe list, and 10 - 15% is [in / to 3% / Africa and the Far East] a carrier in South Europe. As a result of this chronic infection, the danger of generating of the hepatoma increases 100 times and 40% of a virus carrier dies as a result of this infection.

The antibody to L-selectin, a NGF acceptor, or a PDGF acceptor may be suitably used as an antibody in the semantics of this invention.

An example 1 shows the property of the water solution of an antibody (MAB HBV;INN name: Tuvirumab) over the hepatitis B virus containing the phosphate buffer solution and sodium chloride after freezing and defrosting in pH=5, pH=6.5, and pH=8. This shows that freezing and defrosting damage a monoclonal antibody.

An example 2 shows the possibility of stabilization of the preparation object of 2mg this invention using shoe cloth, a maltose or aminosugar (N-methyl glucosamine or galactosamine), arginine phosphate, and Tween 20 among the antibody concentration of 2mg/ml, i.e., a freeze-drying object.

Except for the point that antibody concentration is 8mg/ml, the same preparation object as an example 2 is shown. From Examples 2 and 2a, it the combination of said adjuvant not only avoids the damage over the antibody under freezing, but has the forward effect of the stability on [in long term storage].

An example 3 shows the amino acid in the preparation object of this invention, and the need for a surfactant. Only the shoe cloth as a builder leads an unstable freeze-drying object.

An example 4 indicates the versatility of an amino acid component. This shows that the permutation of the basic amino acid by the neutral amino acid like a leucine or the acidic amino acid like an aspartic acid leads the preparation object of storage stability to change of the basic amino acid in the form of an arginine or an ornithine, and a list.

In an example 5, freeze drying of the pharmaceutical preparation containing a phosphoric-acid buffer and a sodium chloride is compared with shoe cloth, an arginine, and Tween 20 list in various pH values (pH5, pH6.5, and pH8). It is shown that the obtained data can be freeze-dried without spoiling stability in this pH range.

As shown in an example 6, when said surface active agent Tween 20 is replaced by the polyoxyethylene-polyoxypropylene polymer (trade name Pluronic (R)) which is the representation of a surface-active-agent class, this also brings about the suitable stability of the preparation object of this invention.

An example 7 is replaced with shoe cloth, a maltose, or aminosugar (refer to an example 2), and the instability of the pharmaceutical preparation which contains a mannitol as a builder is shown.

A preparation object will become unstable, if sugar and a surfactant are omitted in pharmaceutical preparation as shown in an example 8.

In the example 9, although the combination of the sugar (for example, shoe cloth) which does not contain a surfactant, and amino acid brought about the result good about a content and the parameter of condensation, muddiness increased compared with the pharmaceutical preparation of this invention containing sugar, amino acid, and a surfactant.

An example 10 shows that other monoclonal antibodies may be stabilized by the combination of sugar, amino acid, and a surfactant. For example, the anti--L-selectin antibody is stable in the concentration of 7mg among a freeze-drying object. Freeze drying is begun and carried out from the water solution of 1ml volume.

Approach for measuring stability It stored under un-existing [of light] under the storage condition which had the freeze-drying preparation object defined, and then analyzed. The following test method was used for analysis.

Optical density in OD 280:280nm. The optical measurement method of a protein content and UV extinction are based on a tryptophan, a tyrosin, and the side-chain chromogen like phenylalanine residue. Singularity: 95 - 105%.

SE-HPLC: The size exclusion high performance chromatography for measuring condensation. Singularity: A maximum of 2%.

Measurement of muddiness: After reconfiguring a freeze-drying object, the non-diluted antibody solution was measured in the suitable optical turbidity meter.

Singularity: A maximum of 6 muddiness unit.

Example 1 The stock water solution containing a phosphate buffer solution and a sodium chloride of MAB to said HBV is prepared and examined. The concentration of MAB is about 15mg/ml.

the susceptibility over freezing of a -20 degrees C [in / in table 1a / various pH values] monoclonal antibody -- being shown -- after four weeks -- 92. -- the fall of 1, 94.2, and the protein content to 94.0% is shown.

The fall of a protein content is observed also in storage at 25 degrees C. In a 4-8-degree C storage condition, the antibody is appropriately stable over nine months in a refrigerator.

Tables 1b-1d show stability data (-20 degrees C of the monoclonal antibody solution prepared with pH values 5, 6.5, and 8, 4-8 degrees C, and 25 degrees C). This shows that only storage at 4-8 degrees C is permitted.

Table 1a Antibody in inside of solution (10mM phosphoric-acid buffer, 30mM sodium, water for injection) of active substance Change of a content

	pH 5			pH 6.5			pH 8		
期 間	-20℃	4~8℃	25℃	-20℃	4~8℃	25℃	-20℃	4~8℃	25℃
始 発		>99			>99			>99	
4 週間	92.1	>99	>99	94.2	>99	>99	94.0	>99	>99
13週間	78.9	>99	97.2	81.2	>99	98.1	77.8	>99	96.1
6 ヶ月間	61.2	>99	94.1	69.9	>99	94.4	65.8	>99	91.9
9 ヶ月間	47.8	>99	88.7	55.6	>99	90.2	51.0	>99	84.3

% shows all data. Protein was measured by measurement with an absorbance (OD 280) of 280nm.

table 1b [] generation and the muddiness value of condensation of the active substance

solution (pH=5) of an antibody

時間	-20℃ 凝集 濁り	4~8℃ 凝集 濁り	25℃ 凝集 濁り
始 発	n. d. 1.5	n. d. 1.5	n. d. 1.5
4 週間	凝集 フロキュレーション	n. d. 1.5	0.7% 1.5
13週間	凝集 フロキュレーション	0.2% 1.8	1.9% 1.8
6 ケ月間	凝集 フロキュレーション	0.3% 1.9	凝集 9.9
9 ケ月間	凝集 フロキュレーション	0.6% 2.1	凝集 10.9

n. d.= detection of is not done. Table 1c Generation and the muddiness value of condensation of the active substance solution (pH=6.5) of an antibody

時間	-20℃ 凝集 濁り	4~8℃ 凝集 濁り	25℃ 凝集 濁り
始 発	n. d. 1.2	n. d. 1.2	n. d. 1.2
4 週間	凝集 フロキュレーション	n. d. 1.3	0.5% 1.4
13週間	凝集 フロキュレーション	0.2% 1.4	1.8% 1.7
6 ケ月間	凝集 フロキュレーション	0.3% 1.9	4.9% フロキュレーション
9 ケ月間	凝集 フロキュレーション	0.6% 2.1	9.3% フロキュレーション

d [of tables / 1 /] generation and the muddiness value of condensation of the active substance solution (pH=8) of an antibody

時間	-20℃ 凝集 濁り	4~8℃ 凝集 濁り	25℃ 凝集 濁り
始 発	n. d. 1.4	n. d. 1.4	n. d. 1.4
4 週間	2.0% フロキュレーション	0.3% 1.5	0.74% 1.7
13週間	2.8% フロキュレーション	0.5% 1.8	1.95% 2.1
6 ケ月間	3.7% フロキュレーション	0.6% 1.9	3.0% フロキュレーション
9 ケ月間	5.4% フロキュレーション	0.8% 2.1	4.3% フロキュレーション

% shows condensation using SE-HPLC, muddiness becomes muddy using an optical turbidity meter, and a unit shows it.

Example 2 :shoe cloth (pharmaceutical preparation 1) which added the solution of the monoclonal antibody to HBV given in an example 1 to the water solution of the following sugar containing an arginine-phosphoric-acid buffer and a surfactant Tween 20, or aminosugar, a maltose (pharmaceutical preparation 2), and N-methyl glucosamine (pharmaceutical preparation 3). Pharmaceutical preparation is shown in table 2a. The last concentration of MAB is 2mg/ml. After the phosphoric acid adjusted the pH value to 6.5, the solution was sanitized by filtration (0.22-micrometer millipore filter), and it was sanitized, and it put into the glass bottle by which pyrogen removal was carried out (hydration class I) (restoration volume of 1ml), and freeze-dried. Aeration of the nitrogen was carried out to the injection bottle after freeze drying, and the seal was automatically carried out with the stopper in the freeze-drying chamber, and then the flange was attached.

The injection bottle which attached the flange was stored for four to 13 weeks in various temperature under un-existing [of light]. It examined after these periods by the experiment approach which had the stability of a freeze-drying object indicated.

table 2a [] storage at 25 degree C

	25℃にて 4 週間貯蔵			25℃にて 13週間貯蔵		
	I	II	III	I	II	III
製剤 1 (シュクロース)	100	n. d.	1.7	100	n. d.	1.6
製剤 2 (マルトース)	100	n. d.	1.6	100	n. d.	1.8
製剤 3 (N-メチル-グルコサミン)	100	n. d.	1.8	100	n. d.	1.5

front 2b [] storage at 50 degree C

	50℃にて 4 週間貯蔵			50℃にて 13週間貯蔵		
	I	II	III	I	II	III
製剤 1 (シュクロース)	>99	n. d.	2.0	>99	n. d.	2.0
製剤 2 (マルトース)	>99	n. d.	1.9	>99	n. d.	2.1
製剤 3 (N-メチル-グルコサミン)	>99	n. d.	1.7	>99	n. d.	2.0

Footnote I Protein content measured by OD 280 (%)

II Condensation measured by SE-HPLC (%)

III Muddiness of the reconfigured solution (muddiness unit) (dimensionless number)
n.d.: It is not detected (in all other tables, it is the same).

Example 2a In example 2a, the pharmaceutical preparation 1 (pharmaceutical preparation 2a) of an example 2 was prepared using the 8mg [/ml] antibody. This shows that a 8mg [/ml] high-concentration antibody is appropriately stable in this pharmaceutical preparation.

The presentation of pharmaceutical preparation 1 and 1a

	製剤 1	製剤 1 a
MAB HBV	2.0mg	8.0mg
リン酸緩衝剤	15mM	15mM
塩化ナトリウム	30mM	30mM
シュークロース	68.0mg	58.0mg
アルギニン	10.0mg	10.0mg
リン酸	pH 6.5に調整	pH 6.5に調整
Tween 20	0.1mg	0.1mg
注射用水	1.0mlに調整	1.0mlに調整

table 3a [] the stability data of the pharmaceutical preparation 1 in 25 degree C, and pharmaceutical preparation 1a

	25℃にて 4 週間貯蔵			25℃にて 13週間貯蔵		
	I	II	III	I	II	III
製剤 1 : 2mg/1ml	100	n. d.	1.7	100	n. d.	1.6
製剤 1a : 8mg/1ml	>99	n. d.	4.8	>99	n. d.	4.7

table 3b [] the stability data of the pharmaceutical preparation 1 in 50 degree C, and pharmaceutical preparation 1a

	50℃にて 4 週間貯蔵			50℃にて 13週間貯蔵		
	I	II	III	I	II	III
製剤 1 : 2mg/1ml	>99	n. d.	2.0	>99	n. d.	2.0
製剤 1a : 8mg/1ml	>99	n. d.	4.7	>99	n. d.	5.5

I Protein content measured by OD 280 (%)

II Condensation measured by SE-HPLC (%)

III Muddiness of the reconfigured solution (muddiness unit) (dimensionless number)

Example 3 Comparison of pharmaceutical preparation 1 and pharmaceutical preparation 3. Pharmaceutical preparation 4 contains only shoe cloth as a builder, and does not contain an arginine and Tween 20. Pharmaceutical preparation 4 is unstable.

	製剤 1	製剤 4
MAB HBV	2.0mg	2.0mg
リン酸緩衝剤	15mM	15mM
塩化ナトリウム	30mM	30mM
シュークロース	68.0mg	68.0mg
アルギニン	10.0mg	--
リン酸又はNaOH	pH 6.5に調整	pH 6.5に調整
Tween 20	0.1mg	--
注射用水	1.0mlに調整	1.0mlに調整

table 4a [] store at 25 degree C

	25℃にて 4 週間貯蔵			25℃にて 13週間貯蔵		
	I	II	III	I	II	III
製剤1:シュークロースと共にアルギニン・リン酸及び Tween 20 を含有	100	n. d.	1.7	>99	n. d.	1.6
製剤4:シュークロースを含有するが、アルギニン・リン酸及び Tween 20 を含有せず	98.3	1.6	6.1	96.0	4.3	9.5

table 4b [] store at 50 degree C

	50℃にて4週間貯蔵			50℃にて13週間貯蔵		
	I	II	III	I	II	III
製剤1:シュクロースと共にアルギニン・リン酸及び Tween 20 を含有	100	n. d.	2.0	>99	n. d.	2.0
製剤4:シュクロースを含有するが、アルギニン・リン酸及び Tween 20 を含有せず	96.0	4.2	8.5	89.8	10.1	10.9

Footnote I Protein content measured by OD 280 (%)

II Muddiness of (%) and the condensation which were measured by SE-HPLC, and the reconfigured solution (muddiness unit) (dimensionless number) III Muddiness of the reconfigured solution (muddiness unit) (dimensionless number) Example 4

Versatility of amino acid content of pharmaceutical preparation. The pharmaceutical preparation containing basic amino acid, neutral amino acid, and acidic amino acid is stable.

Presentation of pharmaceutical preparation MAB HBV 2.0mg Phosphoric-acid buffer 15mM(s) Sodium chloride 30mM(s) Shoe cloth 35-70mg Amino acid various -- a phosphoric acid or NaOH pH6.5 -- adjustment Tween 20 0.1mg Water for injection It

表 5

	アミノ酸
製剤 1	アルギニン (塩基性)
製剤 5	オルニチン (塩基性)
製剤 6	ロイシン (中性)
製剤 7	アスパラギン酸 (酸性)

adjusts to 1.0ml.

A phosphoric acid or a hydroxide solution adjusts a pH value.

Table 6 a-d Experimental result of the pharmaceutical preparation 1, 5, 6, and 7 after four weeks and the storage for 13 weeks.

table 6a Pharmaceutical preparation 1 (arginine)

	貯蔵期間 4 週間 25℃ 50℃		貯蔵期間 13週間 25℃ 50℃	
蛋白質含量(%) (OD 280)	100	>99	100	>99
凝集(%) (SE-HPLC)	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
濁り	1.7	2.0	1.6	2.0

table 6b Pharmaceutical preparation 5 (ornithine)

	貯蔵期間 4 週間 25℃ 50℃		貯蔵期間 13週間 25℃ 50℃	
蛋白質含量(%) (OD 280)	>99	>98	>98	>98
凝集 % (SE-HPLC)	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
濁り	1.9	1.9	2.0	2.1

table 6c Pharmaceutical preparation 6 (leucine)

	貯蔵期間 4 週間 25℃ 50℃		貯蔵期間 13週間 25℃ 50℃	
蛋白質含量(%) (OD 280)	>98	>98	>98	>98
凝集 % (SE-HPLC)	n. d.	n. d.	0.1	0.1
濁り	2.2	2.4	2.8	2.7

table 6d Pharmaceutical preparation 7 (aspartic acid)

	貯蔵期間 4 週間 25℃ 50℃		貯蔵期間 13週間 25℃ 50℃	
蛋白質含量(%) (OD 280)	>98	>98	>98	>98
凝集 % (SE-HPLC)	n. d.	n. d.	0.1	0.1
濁り	2.7	2.7	3.4	4.0

Example 5 An example 5 includes the pharmaceutical preparation 1 in various pH values. As the freeze-drying object was indicated in the example 2, it is prepared in it.

The phosphoric acid adjusted pH of the solution of an adjuvant, and a product solution 85% before freeze drying.

Pharmaceutical preparation MAB HBV 2.0mg Phosphoric-acid buffer 15mM(s) Sodium chloride 30mM(s) Shoe cloth 68mg Arginine 10mg Phosphoric acid It adjusts to pH 5; 6.5; 8. Tween 20 0.1mg Water for injection It adjusts to 1.0ml. The freeze-drying object was prepared with the pH value shown in Table 7.

After giving a flange to an injection bottle, they were stored under un-existing [of light] under the temperature conditions on which it was specified. The sample was analyzed after four weeks and the storage for 13 weeks (for a protein content, condensation is muddiness as % by SE-HPLC as % in OD 280). Pharmaceutical preparation was stable in all pH values.

表 7

	pH
製剤 8	5
製剤 9 (1 と同じ)	6.5
製剤 10	8

table 8a [] 25 degree C -- storage

	25℃にて 4 週間貯蔵			25℃にて 13週間貯蔵		
	I	II	III	I	II	III
製剤 8	100	n. d.	1.9	>99	n. d.	2.3
製剤 9 (= 1)	100	n. d.	1.7	100	n. d.	1.6
製剤 10	>99	n. d.	2.3	>99	n. d.	2.6

table 8b [] store at 50 degree C

	50℃にて 4 週間貯蔵			50℃にて 13週間貯蔵		
	I	II	III	I	II	III
製剤 8	>99	n. d.	2.2	>99	n. d.	2.3
製剤 9 (= 1)	>99	n. d.	2.0	>99	n. d.	2.0
製剤 10	>98	n. d.	2.5	>98	n. d.	2.6

Footnote I Protein content measured by OD 280 (%)

II Condensation measured by SE-HPLC (%)

III Muddiness of the reconfigured solution (muddiness unit) (dimensionless number)

Example 6 It is the above, and the following pharmaceutical preparation which contains a surfactant Pluronic F 68 instead of Tween 20 was made and prepared.

Storage and the trial of stability were performed like other examples.

Pharmaceutical preparation 11 MAB HBV 2.0mg Phosphoric-acid buffer 15mM(s)

Sodium chloride 30mM(s) Shoe cloth 48.0mg Arginine 10.0mg Phosphoric acid It

adjusts to pH6.5. Pluronic F 68 0.1mg Water for injection It adjusts to 1.0ml. Except

for the point which contains Tween 20 instead of Pluronic F 68, the same

pharmaceutical preparation 1 as an example 11 is chosen for a comparison. Both

pharmaceutical preparation was stable.

Table 9 surface active agent Pluronic F Stability data of the pharmaceutical preparation containing 68 or Tween 20

	製剤 11				製剤 1			
	貯蔵期間				貯蔵期間			
	4 週間		13週間		4 週間		13週間	
	25℃	50℃	25℃	50℃	25℃	50℃	25℃	50℃
蛋白質含量 (%) (OD 280)	>98	>98	>98	>98	100	>99	100	>99
凝集(%) (SE-HPLC)	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
濁り	1.9	1.9	2.5	2.2	1.7	2.0	1.6	2.0

Example 7 The pharmaceutical preparation 12 indicated in this example is essentially equivalent to pharmaceutical preparation 1 except for the point that the mannitol is used instead of shoe cloth as a builder. It turns out that mannitol pharmaceutical preparation is unstable.

Pharmaceutical preparation 12 MAB HBV 2.0mg Phosphoric-acid buffer 15mM(s)

Sodium chloride 30mM(s) Mannitol 25.0mg Arginine 10.0mg Phosphoric acid It

adjusts to pH6.5. Tween 20 0.1mg Water for injection It adjusts to 1.0ml. Stability data

of the pharmaceutical preparation which contains a mannitol (pharmaceutical

preparation 12) or shoe cloth (pharmaceutical preparation 1) as a Table 10 builder

	製剤 12				製剤 1			
	貯蔵期間				貯蔵期間			
	4 週間		13週間		4 週間		13週間	
	25℃	50℃	25℃	50℃	25℃	50℃	25℃	50℃
蛋白質含量 (%) (OD 280)	96.2	91.8	94.0	84.5	100	>99	100	>99
凝集(%) (SE-HPLC)	3.6	8.4	5.8	15.9	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
濁り	3.2	6.9	4.9	13.2	1.7	2.0	1.6	2.0

Example 8 It provides by the comparison with the pharmaceutical preparation 1 containing all the components listed in the further certification of the need for the combination of sugar, amino acid, and a surfactant, and the pharmaceutical preparation 13 which consisted of an antibody, a phosphoric-acid buffer, a sodium chloride, and arginine phosphate. If there are not sugar and a surfactant, generation of condensation will increase and a muddiness value will get worse.

Pharmaceutical preparation 13 MAB HBV 2.0mg Phosphoric-acid buffer 15mM(s) Sodium chloride 30mM(s) Arginine 35.0mg Phosphoric acid It adjusts to pH6.5. Water for injection It adjusts to 1.0ml. Stability data of the Table 11 pharmaceutical preparation 13 (only arginine phosphate is contained and shoe cloth and Tween 20 are not contained) and pharmaceutical preparation 1

	製剤 13				製剤 1			
	貯蔵期間				貯蔵期間			
	4 週間		13週間		4 週間		13週間	
	25℃	50℃	25℃	50℃	25℃	50℃	25℃	50℃
蛋白質含量 (%) (OD 280)	97.6	94.9	95.8	89.0	100	>99	100	>99
凝集(%) (SE-HPLC)	2.6	4.5	4.0	10.7	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
濁り	2.9	4.5	3.8	12.3	1.7	2.0	1.6	2.0

Example 9 A muddiness value is bad, although a surfactant (Tween 20) is not used but stable pharmaceutical preparation is obtained only by shoe cloth and the arginine

(pharmaceutical preparation 14).

Pharmaceutical preparation 14 MAB HBV 2.0mg Phosphoric-acid buffer 15mM(s) Sodium chloride 30mM(s) Shoe cloth 68.0mg Arginine 10.0mg Phosphoric acid It adjusts to pH6.5. Water for injection It adjusts to 1.0ml. Table 12 Stability data of pharmaceutical preparation 14 and pharmaceutical preparation 1

	製剤 14				製剤 1			
	貯蔵期間				貯蔵期間			
	4 週間		13週間		4 週間		13週間	
	25℃	50℃	25℃	50℃	25℃	50℃	25℃	50℃
蛋白質含量 (%) (OD 280)	>99	>98	>98	>98	100	>99	100	>99
凝集 (%) (SE-HPLC)	0.2	0.3	0.5	1.3	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
濁り	3.4	4.8	8.8	13.3	1.7	2.0	1.6	2.0

Example 10 The following table shows the presentation of pharmaceutical preparation 15. The used antibody is anti--L-selectin. The data shown in table 13a about a soundness test shows that the used pharmaceutical preparation enables suitable stabilization.

The presentation of pharmaceutical preparation 15

	製剤 15
アンチー L -セレクトイン	7.0mg
リン酸緩衝剤	15mM
塩化ナトリウム	30mM
シュークロース	68.0mg
アルギニン	10.0mg
リン酸	pH 6.5に調整
Tween 20	0.1mg
注射用水	1.0mlに調整

table 13a [] the stability data of the pharmaceutical preparation 15 in 25 degree C

	25℃にて 4 週間貯蔵			25℃にて 13週間貯蔵		
	I	II	III	I	II	III
製剤 15 : 7mg/1ml	>99	n. d.	2.5	>99	n. d.	2.9

table 13b [] the stability data of the pharmaceutical preparation 15 in 50 degree C

	50℃にて 4 週間貯蔵			50℃にて 13週間貯蔵		
	I	II	III	I	II	III
製剤 15 : 7mg/1ml	99	n. d.	4.1	99	n. d.	5.2

I Protein content measured by OD 280 (%)

II Condensation measured by SE-HPLC (%)

III Stability of the muddiness (muddiness unit) (dimensionless number) example 11 anti-L-NGFR antibody (anti--L-nerve growth factor acceptor antibody) of the reconfigured solution.

The freeze-drying object of a presentation (similar to pharmaceutical preparation 1) of the pharmaceutical preparation 16 following is prepared.

	製剤 16
抗 - L-NGFR	0.25mg
リン酸緩衝剤	15mM
シュークロース	75mg
アルギニン	10mg
リン酸	pH 6.5に調整
Tween 20	0.1mg
注射用水	1.0mlに調整

The freeze-drying object of anti--L-NGFR is prepared like preparation of the freeze-drying object of MAB-HBV and anti--L-selectin.

The water solution of pH 5-8 containing the sugar, amino acid, and surfactant which are an additive is mixed with the solution of anti-[in a phosphate buffer solution]-NGFR. Phosphate is added so that the concentration specified beforehand may be obtained. Next, filtration disinfection of this is carried out and the solution obtained in

this way is freeze-dried. A perfect freeze-drying cake is optically obtained after freeze drying. There is an anti--L-NGFR antibody to stabilization raw. A transparent solution is obtained after reconstruction of the freeze-drying object by water for injection.

[Translation done.]

AG

* NOTICES *

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

1. Freeze-dried stable physic pharmaceutical preparation of monoclonal antibody or polyclonal antibody containing sugar or aminosugar, amino acid, and surfactant.
2. Pharmaceutical preparation according to claim 1 said whose pharmaceutical preparation does not contain polyethylene glycol and/or protein-Mr. standard physic adjuvant on parenchyma.
3. a) a monoclonal antibody or polyclonal antibody b sugar or aminosugar c amino acid the inorganic acid which acts as a d buffer substance -- and -- e surfactant -- since -- pharmaceutical preparation according to claim 1 or 2 formed substantially.
4. It is pharmaceutical preparation given in any 1 term of claims 1-3 which said sugar is a mono-saccharide, JISAKKARAIDO, or TORISAKKARAIDO, and is shoe cloth, a maltose, trehalose, or a raffinose preferably.
5. Pharmaceutical preparation given in any 1 term of claims 1-4 said whose aminosugar is glucosamine, N-methyl-glucosamine, galactosamine, or new lamin acid.
6. It is pharmaceutical preparation given in any 1 term of claims 1-5 said amino acid is a basic amino acid, acidic amino acid, or neutral amino acid, and is [term] an arginine, a lysine, a histidine, an ornithine, an isoleucine, a leucine, an alanine, glutamic acid, or an aspartic acid preferably.
7. Pharmaceutical preparation given in any 1 term of claims 1-6 said whose surface active agent is polysorbate or polyoxyethylene-polyoxypropylene polymer.
8. Pharmaceutical preparation given in any 1 term containing adjuvant permitted as physic chosen from group which consists of acid, base, buffer, and/or isotonizing agent of claims 1-7.
9. Aquosity physic pharmaceutical preparation of monoclonal antibody or polyclonal antibody obtained by remelting freeze-drying object of publication in any 1 term of claims 1-8.

10. A solution is 5-8, and the aqueous physico pharmaceutical preparation according to claim 9 that has the pH value of 6-7.4 preferably.

11. The approach which manufactures the monoclonal antibody as an active ingredient or a polyclonal antibody, and the aqueous solution that contains a physico adjuvant further by request in a list at the sugar as an additive or aminosugar, amino acid and a surfactant, and a list in the manufacture approach of physico pharmaceutical preparation that the preparation was freeze-dried by any 1 term of claims 1-8, and is characterized by what this solution is freeze-dried for next.

12.a) Use for manufacture of the stable therapy agent containing the antibody of sugar or aminosugar, b amino acid, and c surfactant, or a diagnostic agent.

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2001-503781

(P2001-503781A)

(43) 公表日 平成13年3月21日 (2001.3.21)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	FI	テマコード* (参考)
A 6 1 K 39/395		A 6 1 K 39/395	A
			M
47/18		47/18	
47/26		47/26	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 36 頁)

(21) 出願番号	特願平10-523210	(71) 出願人	ロシュ ダイアグノスティクス ゲゼルシ ャフト ミット ベシュレンクテル ハフ ツング
(86) (22) 出願日	平成9年11月19日 (1997.11.19)		ドイツ連邦共和国, デー—68305 マンハ イム, サントホッフアー シュトラーセ 116
(85) 翻訳文提出日	平成11年5月18日 (1999.5.18)	(72) 発明者	カルメイヤー, ゲオルク
(86) 国際出願番号	PCT/EP 97/06452		ドイツ連邦共和国, デー—68259 マンハ イム, ブッヘナー シュトラーセ 71
(87) 国際公開番号	WO 98/22136	(72) 発明者	ピンター, ゲルハルト
(87) 国際公開日	平成10年5月28日 (1998.5.28)		ドイツ連邦共和国, デー—69221 ドッセ ンハイム, ヤーンシュトラーセ 20エー
(31) 優先権主張番号	96118489.2	(74) 代理人	弁理士 石田 敬 (外4名)
(32) 優先日	平成8年11月19日 (1996.11.19)		
(33) 優先権主張国	ヨーロッパ特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体の安定な凍結乾燥された医薬製剤

(57) 【要約】

本発明は、安定剤として糖又はアミノ糖、アミノ酸及び界面活性剤を含有する、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体の凍結乾燥された医薬製剤に関する。さらに、本発明は、この安定な凍結乾燥物の製造方法、並びに抗体を含有する療法剤又は診断剤のための安定化剤としての、糖又はアミノ糖、アミノ酸及び界面活性剤の使用に関する。

【特許請求の範囲】

1. 糖又はアミノ糖、アミノ酸、及び界面活性剤を含有する、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体の安定な凍結乾燥された医薬製剤。

2. 前記製剤が、ポリエチレングリコール及び／又は蛋白質様標準的医薬補助剤を実質上含有しない、請求項1に記載の製剤。

3. a) モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体、

b) 糖又はアミノ糖、

c) アミノ酸、

d) 緩衝物質として作用する無機酸、及び

e) 界面活性剤、

から実質的に形成される請求項1又は2に記載の製剤。

4. 前記糖がモノサッカライド、ジサッカライド又はトリサッカライドであり、好ましくはシュクロース、マルトース、トレハロース又はラフィノースである、請求項1～3のいずれか1項に記載の製剤。

5. 前記アミノ糖がグルコサミン、N-メチルグルコサミン、ガラクトサミン又はニューラミン酸である、請求項1～4のいずれか1項に記載の製剤。

6. 前記アミノ酸が、塩基性アミノ酸、酸性アミノ酸又は中性アミノ酸であり、好ましくはアルギニン、リジン、ヒスチジン、オルニチン、イソロイシン、ロイシン、アラニン、グルタミン酸又はアスパラギン酸である、請求項1～5のいずれか1項に記載の製剤。

7. 前記界面活性剤がポリソルベート、又はポリオキシエチレンーポリオキシプロピレンポリマーである、請求項1～6のいずれか1項に記載の製剤。

8. 酸、塩基、緩衝剤、及び／又は等張化剤から成る群から選択された医薬として許容される補助物質を含有する、請求項1～7のいずれか1項に記載の製剤。

9. 請求項1～8のいずれか1項に記載の凍結乾燥物を再溶解することにより得られる、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体の水性医薬製剤。

10. 溶液が5～8、好ましくは6～7.4のpH値を有する、請求項9に記載の水

性医薬製剤。

11. 請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の凍結乾燥された医薬製剤の製造方法において、活性成分としてのモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体、並びに添加剤としての糖又はアミノ糖、アミノ酸及び界面活性剤、並びに所望によりさらに医薬補助物質を含有する水性溶液を製造し、そして次にこの溶液を凍結乾燥する、ことを特徴とする方法。

12. a) 糖又はアミノ糖、b) アミノ酸及びc) 界面活性剤の、抗体を含有する安定な療法剤又は診断剤の製造のための使用。

【発明の詳細な説明】

モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体の安定な凍結乾燥された医薬製剤

本発明は、安定剤として糖又はアミノ糖、アミノ酸及び界面活性剤を含有するモノクローナル又はポリクローナル抗体の凍結乾燥された医薬製剤に関する。さらに、本発明は、これらの安定な凍結乾燥物の製剤方法、並びに抗体を含有する療法剤又は診断剤の安定剤としての糖又はアミノ糖、アミノ酸及び界面活性剤の使用に関する。

治療及び診断目的のための免疫グロブリン、特にモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体の製造は今日非常に重要でありそして重要性は連続的に増大している。

医学的製剤としての抗体の使用はすでに長い間知られており、そして多くの用途を有する。従って、抗体は例えば破傷風の予防のため、病原性微生物と戦うため又はそれらの毒素を中和するため、そしてさらに蛇毒による中毒と戦うために好結果をもって使用されてきた。

病気のメカニズムに関連する抗原が同定されれば、これは多くの感染症及び幾らかの癌の場合にそうであるが、治療のために抗体の特異性が利用される。

臨床及び前臨床研究において、抗体は今日コレステロールレベルを低下せしめるため、アンジオテンシン／レニン系に影響を与えるため、及び自己免疫疾患、例えば狼瘡、自己免疫性脳炎、多発性硬化症、多発性関節炎及び自己免疫性筋無力症において使用されている。

さらに、主たる療法的重要性は、ジゴキシン又は強心配糖体ジギトニン及びウアバインによる中毒のために使用される場合抗ジゴキシン抗体のFab断片のごとき低分子量物質による中毒に対抗するためのそれらの使用である。さらに、抗体は蛋白質の内容物を同定し、精製しそして測定するための診断分野において使用される。

1970年代の後半及び1980年代における、細菌培養でのモノクローナル抗体の生産という革命を起こした遺伝子工学は抗体の製造を大いに発展させた。

このような多様な用途を満たすため、貯蔵中に安定であるモノクローナル抗体

及びポリクローナル抗体の医薬製剤を手にすることが重要である。特定の抗体の液体製剤及び凍結乾燥物に関する多くの刊行物が存在する。すなわち、例えば、抗体の液体製剤はEP 0,280,358, EP 0,170,983, WO 89/11298, EP 0,352,500、及び特開昭63-088197に記載されている。

EP 0,280,358によれば、ある種のホルモンに対して抗体溶液を安定化するために抗体溶液にデキストランが添加され、これにより9ヶ月にわたる安定化を達成することができた。EP 0,170,987によれば、加熱した際に熱感受性であるモノクローナル抗体を安定化するために、加水分解されたオボアルブミンが添加され、この結果抗体は45℃にて7日間貯蔵した後においてもなお使用可能であった。ポリヒドロキシアルコール（例えばグリセロール、イノシトール、ポリビニルアルコール）又は糖（例えばシュクロース及びグルコース）、又はグリシトール（例えばソルビトール、マンニトール）は特開昭63-088197から液体製剤のための更なる安定剤として知られている。WO 89/11298は、モノクローナル抗体の液体安定化のためのさらなる方法として塩化ナトリウムを含有するリン酸緩衝液中でのマルトースの使用を示している。EP 0,352,500はモノクローナ

ル抗体の溶液安定化のためのポリエチレングリコール4000及び3-プロピオラクトンを記載している。

しかしながら一般に、液体製剤は貯蔵安定性のために最適な溶液ではない。なぜなら、蛋白質又はその凝集体は、高温において、異なる気候帯を通して輸送される場合又は不適当な貯蔵（例えば冷却の中断）により、貯蔵中に時間と共に沈澱し、そしてそれ故に溶液は低下した蛋白質含量を有し、そして濁るであろう。従って、これらの場合、問題のない溶液は保証され得ない。

これに対して、凍結乾燥製剤の場合、水の除去が分解生成物の生成（例えば脱アミド化及び加水分解による）及び凝集体の形成を最小にする。水分残量（結合水）は、特に糖の存在下で、安定性に寄与することができる(Hsuら、Der.Biol.Stand. 1991, 74:255-267;及びPikalら、Der.Biol.Stand. 1991, 74:21-27)。

活性物質として特定の抗体を含有する凍結乾燥物が文献から知られているが、これらは安定化の問題に対して一貫したアドバイスを提供しない。すなわち、WO

93/00807には、冷却保護膜（例えばポリエチレングリコール）及び蛋白質と水素橋を形成することができる化合物から成る2成分系により生物材料、例えばヒト蛋白質、成長ホルモン類、インターロイキン類、酵素並びにさらにモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を安定化することが記載されている。しかしながら、これらの製剤の欠点は、もし生物分解が生じなければ、ポリエチレングリコールのごとき高分子化合物の添加が、潜在的に毒性の副作用を伴って体内に蓄積することである。さらに、周知のごとく、ポリマーはそのモル量に依存して抗原として働く可能性がある。

凍結の際に不安定なモノクローナル抗体の凍結乾燥物は、出願公開60-146833によれば、アルブミン（ヒト、ウマ又はウシのアルブ

ミン）の添加により1年間安定化される。ヒト血清アルブミン(HSA)はまた、シェルドモナス・アエルギノーサの感染の治療のためのモノクローナル抗体を安定化するために炭水化物（例えば、デキストロースシュークロース又はマルトース）との組合せにおいて、EP 0,303,088に記載されている。

ヒト血清アルブミン（糖及びアミノ酸との組合せにおいて）はまた、EP 0,413,188においてモノクローナル抗体が安定化されるための原理である。特開平1-075,433においては、ヒト血清アルブミン、マンニトール及びポリエチレングリコール混合物が、凍結乾燥物としてのヒトモノクローナル抗体を安定化するために使用される。凍結乾燥中のγグロブリンの安定化のための、ポリエチレングリコールのごとき高分子及びヒト血清アルブミンのごとき保護蛋白質の使用が、WO 84/00890に示されている。

HagiwaraらのWO 93/01835には、塩化ナトリウム及びリン酸緩衝液を含有する溶液中マンニトール及びグリシンを用いての、凍結乾燥によるヒトモノクローナル抗体の安定化が記載されている。凍結、凍結乾燥及び再構成について安定な製剤が得られる。

Draberら(J. Immun. Methods, 1995, 181:37-43)は、トレハロースのみの添加により、又はポリエチレングリコール8,000との組合せにおいて、4℃にて、マウスからのモノクローナルIgM抗体の安定な製剤を製造することができた。しか

しながら、抗体は50℃にてわずか14日間安定であった。他のモノサッカライド又はジサッカライド、例えばシュクロース、マルトース、ラクトース又はガラクトースのみを用いて、これらの抗体を安定化することは不可能であった。

WO 89/11297においては、炭水化物（マルトース）と酸領域での緩衝液（酢酸緩衝液）を用いて、マウスからのモノクローナル抗

体が安定な凍結乾燥物に転換される。この場合、欠点は酸領域の緩衝化への限定である。

WO 92/15,331においては、凍結乾燥物中の凍結保護剤及び安定剤として高分子ゼラチンが使用される。安定化はまた、6.8～8.1のpH範囲においてカルボン酸（例えばクエン酸）又はその塩と、一級、二級もしくは三級アルコール又はアミノ酸との組合せにおいても達成される。

前記の刊行物のすべてにおいて、医学的観点から許容されない医薬添加剤又は助剤物質が安定剤として提案されている。すなわち、ポリマー（例えばPEG又はゼラチン）及び蛋白質（例えば血清アルブミン）は、それらの由来及び理化学的性質によりある種の危険を持ち出し、アナフィラクシーショックの点までアレルギー反応を開始する可能性がある。ヒト又は動物由来の蛋白質及び細胞培養から得られる蛋白質はウイルス汚染の危険を有する。しかしながら、分析的に検出するのが困難な他の蛋白質様汚染が、その性質のためにヒトにおいて免疫反応を生じさせる可能性がある。

例えばポリエチレングリコール(PEG)又はゼラチンのごとき高分子物質の添加は、生物分解がなければ、潜在的に毒性の副作用を伴って体内に蓄積する可能性がある。ポリマーはまた、その分子量に依存して抗原特性を有する。さらに、製造中に使用された触媒又はモノマー及び他のポリマー断片の存在のために、ポリマーの純度を保証することは困難である。他のタイプの安定化が可能であれば、医薬投与形、特に皮下投与可能な医薬形でのポリマーの使用は回避されるべきである。

他方、抗体が凍結乾燥される場合、他の添加物を伴わない糖のみの使用は常に適当な保護効果を保証するとは限らない。

従って、本発明の目的は、前記のポリマー又は蛋白質性医薬助剤

を実質的に含まないモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体の安定な医薬製剤を提供することである。これは特に、1回又は複数回の凍結及び解凍に対して感受性の抗体に適用される。

驚くべきことに、添加剤として糖又はアミノ糖、アミノ酸及び界面活性剤を含有せしめることにより、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体の安定な医薬凍結乾燥物が得られることが見出された。この凍結乾燥物は好ましくは、a) 抗体、b) 糖又はアミノ糖、c) アミノ酸、d) pH値を調整するための緩衝剤、及びe) 界面活性剤から構成される。単一の又は異なる2種類のアミノ酸のみを含有する凍結乾燥物が特に好ましい。

これらの調製物は生理学的によく耐えられ、比較的単純な組成を有し、そして正確に投与され得る。さらに、これらは安定である。すなわち、これらは、多数回の凍結及び解凍にかけられた場合並びに長い貯蔵期間において、検出可能な分解生成物又は蛋白質凝物を示さない。この凍結乾燥物は、安定性の問題を伴わないで冷蔵庫温度（4～12℃）において、又は室温（18～23℃）においてさえ、少なくとも3ヶ月、好ましくは少なくとも6ヶ月、そして特に1～2年間にわたり貯蔵することができる。さらに、これらはまた、より高温（例えば30℃まで）において貯蔵された場合も安定である。貯蔵安定性は例えば、凍結乾燥物が容器中で注射用水又は等張溶液により再構成される場合、前記の貯蔵期間中に非常に少数の粒子が検出されることにより示される。特に、容器は、粒子サイズが10 μ mより大きな粒子を6000個未満、及び／又は粒子サイズが25 μ mより大きな粒子を600個未満有する。こうして調製された溶液は約5日間まで、好ましくは3日間まで安定である。

添加物の選択された組合せのために調製物が凍結に対して保護するということは特に有利である。すなわち特に、このことは、抗体

の安定性を損ねることなく-45℃までの温度における凍結乾燥を可能にする。さらに、本発明の添加剤の組合せを含んで成る凍結乾燥物は比較的高温においてさ

え、長期間にわたりそして貯蔵中は安定である。特に従来の製剤に比べて、それらは水による再構成の後に粒子の形成を示さない。すなわち溶液はほとんど濁りを有しない。

本発明の調製物は、医学的観点及使用に問題がある蛋白質様又は高分子補助物質を実質上含有しない。約5～8のpH値、好ましくは6.0～7.0のpH値(血液のpH値は7.2～7.4)を有する抗体を含有する液体の療法剤又は診断剤が凍結乾燥物の溶解により得られるという事実のため、これらは、よく耐えられそして実質的に痛みを伴わないで投与され得るという追加の利点を有する。これは特に皮下投与のために重要である。なぜなら、静脈投与に比べて皮下投与は耐えられない痛みを生じさせるからである。

本発明の製剤は一般に、抗体の臨床的に意味のある濃度範囲、例えば20mg/mlまで、好ましくは10mg/mlまでの濃度で製造することができる。好ましい濃度範囲は、0.01mg/ml以上、特に0.05及び0.1mg/ml以上である。特に、0.05～10mg/ml、又は0.1～5mg/ml、例えば5, 8又は10mg/mlの濃度範囲が使用される。使用される溶液の注射体積は、皮下注射又は静脈注射の場合は2ml未満であり、好ましくは約1mlである。小注射体積は特に、皮下組織にわずかな刺激しか与えないので、皮下投与が好ましい。基本的には、溶液はまた、注入溶液として、又は注入溶液の添加剤としても直接適当である。これらが注入溶液の添加剤として使用される場合、抗体の濃度により高いレベルであり、例えば10mg/mlまでである。抗体のこれらの濃縮溶液は次に常用の注入溶液に添加され、これにより投与されるべき注入溶液中の抗体濃度医薬として意味のある範囲とされる。この範囲は通常0.001～0.5mg/mlである。

単位投与形医薬はすぐに使用できる注入溶液もしくは注射溶液又は凍結乾燥物として存在し得る。医薬製剤が凍結乾燥物の形で使用される場合、単位投与容器、例えば10ml容積のガラスアンプルは、抗体のそれぞれの医薬として意味のある投与量に依存して0.1～500mg、好ましくは10～100mgの抗体を含有する。凍結乾燥物は任意に、追加の常用の医薬賦形剤を含有する。凍結乾燥物は適当量の再構成溶液に溶解され、そして次に注射溶液として直接使用することができ、又は注

入溶液の添加物として使用することができる。注入溶液の添加物として使用される場合、凍結乾燥物は通常約10mlの再構成溶液で溶解され、そして250mlの生理的食塩水(0.9% NaCl)に添加される。得られる注入溶液は次に約30分以内に患者に投与される。

本発明に従って使用される糖はモノサッカライド、ジサッカライド又はトリサッカライドであることができる。グルコース、マンノース、ガラクトース、フラクトース及びソルボースがモノサッカライドとして考慮される。シュクロース、ラクトース、マルトース又はトレハロースがジサッカライドとして考慮される。トリサッカライドとしてラフィノースが好適に使用される。本発明によれば、シュクロース、ラクトース、マルトース、ラフィノース又はトレハロースが特に好適に使用される。マルトースの代りに、立体異性体のジサッカライドであるセロビオース、ゲンチオビオース又はイソマルトースを使用することもできる。

ヒドロキシル基の代りにアミノ基 ($-NH_2$, $-NHR$, $-NR_2$) 又はアシル化されたアミノ基 ($-NH-CO-R$) を有するモノサッカライドは一般にアミノ糖と称されそして使用される。本発明によれば、このため、グルコサミン、N-メチルグルコサミン、ガラクトサミン及びニューラミン酸(neuraminic acid)が特に好ましい。糖含量又は

アミノ含量は、単位投与形当り例えば2000mgまで、好ましくは1000mgまで、特に好ましくは800又は500mgまでである。糖含量の下限としては、例えば10、50又は100mg以上が考慮される。好ましい範囲は200~1000mg、特に400~800mgである。単位投与形当りの上記の量は、凍結乾燥物として市販される単位投与形に関する。このような凍結乾燥物は好ましくは容量10mlの注射ビンに充填される。凍結乾燥物を10mlの再構成溶液により溶解した後、直接投与することができる液体投与形が得られる。これらの注射溶液中の糖濃度は、使用される糖の上記の量に基づいて、200mg/mlまで、好ましくは100mg/mlまでである。

本発明に従って使用されるアミノ酸は塩基性アミノ酸、例えばアルギニン、リジン、ヒスチジン、オルニチン等であることができ、アミノ酸は好ましくはその無機塩の形(好ましくは、リン酸塩の形、すなわちリン酸アミノ酸として)で使

用される。遊離アミノ酸が使用される場合、好ましいpH値は、適当な生理的に許容される緩衝物質、例えば無機酸、特にリン酸、硫酸、酢酸、蟻酸又はこれらの塩の添加により調整される。この場合、リン酸塩の使用は、特に安定な凍結乾燥物が得られる点で特に有利である。調製物が有機酸、例えばリンゴ酸、酒石酸、クエン酸、コハク酸、フマル酸等を実質的に含有しない場合あるいは対応する陰イオン（リンゴ酸イオン、酒石酸イオン、クエン酸イオン、コハク酸イオン、フマル酸イオン等）が存在しない場合に、特に有利である。

好ましいアミノ酸はアルギニン、リジン又はオルニチンである。さらに、酸性アミノ酸、例えばグルタミン酸及びアスパラギン酸、あるいは中性アミノ酸、例えばイソロイシン、ロイシン及びアラニン、あるいは芳香族アミノ酸、例えばフェニルアラニン、チロシン又はトリプトファンを使用することもできる。本発明の水性調製物

中のアミノ酸含量は、100mg/mlまで、好ましくは50mg/mlまで、又は30mg/mlまでである。下限は例えば、1、5又は10mg/ml以上の濃度である。好ましい濃度は、例えば、3～30mg/ml又は10～25mg/mlの範囲である。対応する投与形が凍結乾燥物として販売される場合、これらの凍結乾燥物は好ましくは注射用ビン（例えば容量が10ml）中に得られる。このような単位投与形は、1000mgまで、好ましくは500mgまで、又は300mgまでの量でアミノ酸を含有する。

考慮される界面活性剤は、医薬製剤中に通常使用されるすべての界面活性剤、好ましくはポリソルベート及びポリオキシエチレンーポリオキシプロピレンコポリマー、例えばTween^(R) である。0.05～0.5mg/ml、好ましくは0.1mg/mlという少量の界面活性剤が抗体を安定化するために十分である。上記の単位投与形において、10mlの注射ビンに充填される凍結乾燥物の場合、界面活性剤の量は0.5～5mgである。

前記の添加剤により達成される抗体の安定化は、原理的には、すべての既知モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体並びにそれらのFab断片に関する。ヒト化抗体及び修飾された抗体（例えば米国特許No. 5,624,821；EP 0,592,106；PCT/EP96/00098を参照のこと）が好適に使用される。抗体の分子量は分子単位当

たり50kDa～200kDaであり、特に分子量は約80～150kDaである。特に、B型肝炎ウイルス(WO 94/11494を参照のこと)、AIDSウイルス、サイトメガロウイルス、髄膜脳炎ウイルス(FSME)、風疹(rubella)ウイルス、ハシカ(measles)ウイルス、狂犬病病原体、シュドモナス・アエルギノーサ細菌、水痘-帯状疱疹ウイルス、破傷風病原体、ファン・ビルブラント因子(van Willebrandt factor)(WO 96/17078を参照のこと)、NGFR(神経成長因子受容体)、PDGFR(血小板由来成長因子; Shulman, Sauer, Jackman, Chang, Landolfi, J. Biol. Chem., 1997, 272(28): 17400-4)、セレクチン、特にE-セレクチン、L-セレクチン(Takashiら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87: 2244-2288; WO 94/12215を参照のこと)又はP-セレクチン; インテグリン、又はジフテリア病原体に対する抗体を、本発明に従って安定化することができる。抗体濃度は好ましくは8mg/mlまでであることができる。例えば0.05～2mg/mlが好ましい。単位投与形、例えば10mlの注射ビン中の凍結乾燥物中の抗体の量は、100mgまで、好ましくは80mg, 50mg, 20mg又は10mgまでである。10mlの容量により凍結乾燥物を再構成した後の抗体の濃度は1～10mg/ml、好ましくは5～8mg/mlの範囲である。

前記の添加、すなわち糖、アミノ酸及び界面活性剤に加えて、本発明の凍結乾燥物は、pH値を5～8、好ましくは6.0～7.4に調整するための、酸、塩基、緩衝剤又は等張剤から成る群から選択された生理的に許容される補助物質を含有することができる。本発明の調製物の緩衝能力は、例えば注射用水のごとき標準的再構成溶液により凍結乾燥物が溶解された場合は、緩衝液の濃度が10～20mmol/L、好ましくは約15mmol/Lの範囲になるように調整される。

種々の補助物質又は抗体の添加順序は、製造方法に大きく依存し、そして当業者の判断にゆだねられる。溶液の所望のpH値は、例えば水酸化アルカリ、アルカリ土類水酸化物、又は水酸化アルミニウムの添加により調整される。このために好ましくは水酸化ナトリウムが使用される。所望のpH値は原則として塩基性溶液の添加により調整される。この意味において、弱酸と強塩基との塩、例えば、酢酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、第二リン酸ナトリウムもしくは第一リン酸

ナトリウム、又は炭酸ナトリウムが一般に好ましい。補助物質の医薬溶液が塩基性pH値を有する場合、このものは、所望のpH値に達するまで滴定により調整される。例えば塩酸、リン酸、

酢酸、クエン酸、又は酸性pH値を有する物質の常用の溶液のごとき、医薬として許容される無機又は有機の酸が考慮される。この意味において好ましい物質は、例えばリン酸二水素ナトリウム又はリン酸水素二ナトリウムのごとき、弱塩基と強酸との塩である。溶液のpH値は好ましくは、リン酸又は水酸化ナトリウム水溶液により調整される。

抗体及び定量化のために使用される添加剤の浸透圧性によっては等張性が達成され得ない場合、よく許容される非経腸剤を製造するために、等張化補助物質が添加される。このためにはまず、よく許容される非イオン性補助物質が使用される。しかしながら、投与用の注射液又は注入液中の最終濃度が30mmol/Lを超えない範囲で、少量の塩、例えば塩化ナトリウムを添加することができる。

さらに、医薬製剤は、さらなる一般的な補助物質又は添加剤を含有することができる。抗酸化剤、例えばグルタチオンもしくはアスコルビン酸又は類似の物質を添加することができる。

凍結乾燥物を製造するため、まず抗体を含有する医薬水溶液が製造される。好ましくは塩化ナトリウムを含有する緩衝化された抗体溶液が調製される。この抗体溶液が添加剤である糖、アミノ酸及び界面活性剤を含有する水溶液と混合され、この間にpH値は酸又は塩基により5～8に調整される。あらかじめ決定された濃度が得られるようにリン酸又はリン酸塩及び塩化ナトリウムが添加される。次に、濾過により除菌され、そしてこうして調製された溶液が凍結乾燥される。

本発明はまた、凍結に対して感受性の抗体を含有する不安定な水溶液を、凍結乾燥の手段により、高温において品質を損うことなく安定な調製物に変えることを可能にする。

本発明の凍結乾燥物のさらなる利点は、凍結中の抗体に対する損

傷を回避するのみならず、50℃での長期間の貯蔵の後でさえ抗体量の減少及び凝

集の生成を示さないことである。注射用水による凍結乾燥物の再構成の後に濁りの低い値により示される粒子の形成が回避される。

本発明は、下記実施例の適用によりさらに詳細に説明する。

実施例1～10は、本発明の凍結乾燥物を製剤化し、製造し、そして抗体の安定性について試験する態様を示す。

補助物質を含まない、又はシュークロースのみを含む、又は糖成分の代替物としてマンニトールを含む、又はアミノ酸成分のみを含む、又は界面活性剤を含まずアミノ酸成分のみもしくは糖のみを含む比較実験が示すところによれば、安定な製剤を達成するためには本発明に従う添加物の選択が必須である。シュークロースのみ、アミノ酸のみ、又は界面活性剤を伴わない両成分は不安定な製剤をもたらす。

本発明の製剤は凍結に対して不感受性であり、そしてポリエチレングリコール、ゼラチン、血清アルブミンのごとき毒性があると考えられるポリマー又は蛋白質を完全に排除することができる。界面活性剤の場合、比較的少量の生理的に許容される界面活性剤が存在する。

次の実施例において使用されるHBVに対する抗体は、ネズミの細胞由来の組換えヒトモノクローナル抗体(MAB)である。これは約147kDaの分子量を有し、そしてB型肝炎ウイルスのB型肝炎表面抗原(HBsAg)に向けられている。このモノクローナル抗体は、このウイルスのほとんどすべての既知の変異体において一定であるHBsAgのa-決定基を認識する。この抗体は例えば次の医薬用途のために使用することができる：従来満足すべき治療方法が存在しなかった慢性肝炎の治療、HBsAg-陽性移植患者における受動免疫予防治療。

中央ヨーロッパ及び北ヨーロッパ並びに米国において、人口の2%までがB型肝炎ウイルスのキャリアーであり、南ヨーロッパにおいて3%まで、アフリカ及び極東において10～15%がキャリアーである。この慢性感染の結果、肝細胞癌の発生の危険性は100倍増加し、この感染の結果としてウイルスキャリアーの40%が死亡する。

L-セレクチン、NGF受容体又はPDGF受容体に対する抗体は本発明の意味にお

ける抗体として好適に使用され得る。

実施例1は、凍結及び解凍後の、リン酸緩衝液及び塩化ナトリウムを含有する、 $\text{pH}=5$ 、 $\text{pH}=6.5$ 及び $\text{pH}=8$ におけるB型肝炎ウイルスに対する抗体(MAB HBV; INN名称: Tuvirumab)の水溶液の性質を示す。これは、凍結及び解凍がモノクローナル抗体を損傷することを示す。

実施例2は、シュークロース又はマルトース又はアミノ糖(N-メチルグルコサミン又はガラクトサミン)とアルギニンホスフェートとTween 20を用い、抗体濃度 2mg/ml すなわち凍結乾燥物中 2mg の本発明の調製物の安定化の可能性を示す。

抗体濃度が 8mg/ml である点を除き実施例2と同じ調製物を示す。実施例2及び2aから、前記補助物質の組合わせは凍結中の抗体に対する損傷を回避するのみならず長期貯蔵中の安定性への正の影響を有する。

実施例3は、本発明の調製物中のアミノ酸及び界面活性剤の必要性を示す。ビルダーとしてのシュークロースのみは不安定な凍結乾燥物を導く。

実施例4はアミノ酸成分の多様性を記載する。これは、アルギニン又はオルニチンの形での塩基性アミノ酸の変化、並びに例えばロイシンのごとき中性アミノ酸又は例えばアスパラギン酸のごとき酸性アミノ酸による塩基性アミノ酸の置換が貯蔵安定性の調製物を導

くことを示す。

実施例5において、シュークロース、アルギニン及びTween 20並びにリン酸緩衝剤及び塩化ナトリウムを含有する製剤の凍結乾燥を種々の pH 値($\text{pH} 5$ 、 $\text{pH} 6.5$ 及び $\text{pH} 8$)において比較する。得られたデータは、この pH 範囲において安定性を損うことなく凍結乾燥できることを示している。

実施例6に示すように、前記界面活性剤Tween 20を、界面活性剤クラスの代表であるポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンポリマー(商品名Pluronic[®])により置き替えた場合、これもまた本発明の調製物の適当な安定性をもたらす。

実施例7は、シュークロース、マルトース又はアミノ糖(実施例2を参照のこ

と)に代えて、ビルダーとしてマンニトールを含有する製剤の不安定性を示す。

実施例8に示す通り、製剤中で糖及び界面活性剤が省略されれば、調製物は不安定となる。

実施例9において、界面活性剤を含まない糖(例えば、シュクロース)及びアミノ酸の組合わせは含量及び凝集のパラメーターについて良好な結果をもたらすが、しかしながら、糖、アミノ酸及び界面活性剤を含有する本発明の製剤に比べて濁りは増加した。

実施例10は、糖、アミノ酸及び界面活性剤の組合せにより他のモノクローナル抗体が安定化され得ることを示す。例えば、抗-L-セレクトリン抗体は凍結乾燥物中7mgの濃度において安定である。凍結乾燥は、1ml体積の水溶液から始めて実施される。

安定性を測定するための研究方法

凍結乾燥調製物を定義された貯蔵条件下で光の不存在下で貯蔵し、そして次に分析した。分析のために次の試験方法を用いた。

OD 280 : 280nmにおける光学濃度。蛋白質含量の光学測定法、UV

吸光はトリプトファン、チロシン及びフェニルアラニン残基のごとき側鎖色原体に基く。特異性 : 95~105%。

SE-HPLC : 凝集を測定するためのサイズ排除高性能クロマトグラフィー。特異性 : 最高2%。

濁りの測定 : 凍結乾燥物を再構成した後、未希釈の抗体溶液を適当な光濁度計において測定した。特異性 : 最大6濁りユニット。

実施例1

リン酸緩衝液及び塩化ナトリウムを含有する、前記HBVに対するMABのストック水溶液を調製しそして試験する。MABの濃度は約15mg/mlである。

表1aは、種々のpH値における-20℃でのモノクローナル抗体の凍結に対する感受性を示し、4週間後に92.1、94.2及び94.0%への蛋白質含量の低下を示す。25℃での貯蔵においても蛋白質含量の低下が観察される。冷蔵庫にて4~8℃の貯蔵条件において、抗体は適切に9ヶ月にわたって安定である。

表1b～1dはpH値5、6.5及び8で調製されたモノクローナル抗体溶液の、
 -20℃、4～8℃及び25℃での安定性データを示す。これは4～8℃での貯蔵
 のみが許容されることを示す。

表1a

活性物質の溶液（10mMリン酸緩衝剤、30mMナトリウム、注射用水）中での抗体
 含量の変化

期 間	pH 5			pH 6.5			pH 8		
	-20℃	4~8℃	25℃	-20℃	4~8℃	25℃	-20℃	4~8℃	25℃
始 発		>99			>99			>99	
4週間	92.1	>99	>99	94.2	>99	>99	94.0	>99	>99
13週間	78.9	>99	97.2	81.2	>99	98.1	77.8	>99	96.1
6ヶ月間	61.2	>99	94.1	69.9	>99	94.4	65.8	>99	91.9
9ヶ月間	47.8	>99	88.7	55.6	>99	90.2	51.0	>99	84.3

すべてのデータは%で示す。蛋白質は280nmでの吸光度（OD 280）の測定に
 より測定した。

表1b

抗体の活性物質溶液（pH=5）の凝集の生成及び濁り値

時間	-20℃		4~8℃		25℃	
	凝集	濁り	凝集	濁り	凝集	濁り
始 発	n. d.	1.5	n. d.	1.5	n. d.	1.5
4 週間	凝集	フロキュレーション	n. d.	1.5	0.7%	1.5
13週間	凝集	フロキュレーション	0.2%	1.8	1.9%	1.8
6 ヶ月間	凝集	フロキュレーション	0.3%	1.9	凝集	9.9
9 ヶ月間	凝集	フロキュレーション	0.6%	2.1	凝集	10.9

n. d. = 検出されず

表1c

抗体の活性物質溶液 (pH=6.5) の凝集の生成及び濁り値

時間	-20℃ 凝集 濁り	4~8℃ 凝集 濁り	25℃ 凝集 濁り
始 発	n. d. 1.2	n. d. 1.2	n. d. 1.2
4 週間	凝集 フロキュレーション	n. d. 1.3	0.5% 1.4
13週間	凝集 フロキュレーション	0.2% 1.4	1.8% 1.7
6 ヶ月間	凝集 フロキュレーション	0.3% 1.9	4.9% フロキュレーション
9 ヶ月間	凝集 フロキュレーション	0.6% 2.1	9.3% フロキュレーション

表 1 d

抗体の活性物質溶液 (pH=8) の凝集の生成及び濁り値

時間	-20℃ 凝集 濁り	4~8℃ 凝集 濁り	25℃ 凝集 濁り
始 発	n. d. 1.4	n. d. 1.4	n. d. 1.4
4 週間	2.0% フロキュレーション	0.3% 1.5	0.74% 1.7
13週間	2.8% フロキュレーション	0.5% 1.8	1.95% 2.1
6 ヶ月間	3.7% フロキュレーション	0.6% 1.9	3.0% フロキュレーション
9 ヶ月間	5.4% フロキュレーション	0.8% 2.1	4.3% フロキュレーション

凝集はSE-HPLCを用いて%で示し、濁りは光濁度計を用いて濁りユニットで示す。

実施例 2

実施例 1 に記載のHBVに対するモノクローナル抗体の溶液を、アルギニンリン酸緩衝剤及び界面活性剤Tween 20を含有する、次の糖又はアミノ糖の水溶液に加えた：シュークロース（製剤 1）、マルトース（製剤 2）、及びN-メチルグルコサミン（製剤 3）。製剤

を表 2 a に示す。MABの最終濃度は2 mg/mlである。リン酸によりpH値を6.5に調整した後、溶液を濾過（0.22 μm膜フィルター）により無菌化し、そして無菌化されそしてパイロジエン除去されたガラス製ビンに入れ（水和性クラス I）（充填

体積1ml)、そして凍結乾燥した。凍結乾燥の後、注射ビンに窒素を通気し、凍結乾燥チャンバー中でストッパーにより自動的にシールし、そして次にフランジを付した。

フランジを付した注射ビンを光の不存在下で、種々の温度において4～13週間貯蔵した。これらの期間の後、凍結乾燥物の安定性を記載された実験方法により試験した。

表2 a

25℃での貯蔵

	25℃にて4週間貯蔵			25℃にて13週間貯蔵		
	I	II	III	I	II	III
製剤1 (シュクロース)	100	n. d.	1.7	100	n. d.	1.6
製剤2 (マルトース)	100	n. d.	1.6	100	n. d.	1.8
製剤3 (N-メチル-グルコサミン)	100	n. d.	1.8	100	n. d.	1.5

表2 b

50℃での貯蔵

	50℃にて4週間貯蔵			50℃にて13週間貯蔵		
	I	II	III	I	II	III
製剤1 (シュクロース)	>99	n. d.	2.0	>99	n. d.	2.0
製剤2 (マルトース)	>99	n. d.	1.9	>99	n. d.	2.1
製剤3 (N-メチル-グルコサミン)	>99	n. d.	1.7	>99	n. d.	2.0

脚注

I OD 280により測定した蛋白質含量 (%)

II SE-HPLCで測定した凝集 (%)

III 再構成された溶液の濁り(濁りユニット)(無次元数)

n. d. : 検出されず (他のすべての表において同じ)

実施例2 a

実施例2 aにおいて、8mg/mlの抗体を用いて、実施例2の製剤1（製剤2 a）を調製した。これは、この製剤中で8mg/mlの高濃度の抗体が適切に安定であることを示す。

製剤1及び1 aの組成

	製剤1	製剤1 a
MAB HBV	2.0mg	8.0mg
リン酸緩衝剤	15mM	15mM
塩化ナトリウム	30mM	30mM
シュークロース	68.0mg	58.0mg
アルギニン	10.0mg	10.0mg
リン酸	pH 6.5に調整	pH 6.5に調整
Tween 20	0.1mg	0.1mg
注射用水	1.0mlに調整	1.0mlに調整

表3 a

25℃での製剤1及び製剤1 aの安定性データ

	25℃にて4週間貯蔵			25℃にて13週間貯蔵		
	I	II	III	I	II	III
製剤1 : 2mg/1ml	100	n. d.	1.7	100	n. d.	1.6
製剤1a : 8mg/1ml	>99	n. d.	4.8	>99	n. d.	4.7

表3 b

50℃における製剤1及び製剤1 aの安定性データ

	50℃にて4週間貯蔵			50℃にて13週間貯蔵		
	I	II	III	I	II	III
製剤1 : 2mg/1ml	>99	n. d.	2.0	>99	n. d.	2.0
製剤1a : 8mg/1ml	>99	n. d.	4.7	>99	n. d.	5.5

I OD 280により測定した蛋白質含量 (%)

II SE-HPLCにより測定した凝集 (%)

III 再構成された溶液の濁り (濁りユニット) (無次元数)

実施例 3

製剤 1 及び製剤 3 の比較。製剤 4 はビルダーとしてシュクロースのみを含有し、アルギニン及び Tween 20 を含有しない。製剤 4 は不安定である。

	製剤 1	製剤 4
MAB HBV	2.0mg	2.0mg
リン酸緩衝剤	15mM	15mM
塩化ナトリウム	30mM	30mM
シュクロース	68.0mg	68.0mg
アルギニン	10.0mg	--
リン酸又は NaOH	pH 6.5 に調整	pH 6.5 に調整
Tween 20	0.1mg	--
注射用水	1.0ml に調整	1.0ml に調整

表 4 a

25℃にて貯蔵

	25℃にて4週間貯蔵			25℃にて13週間貯蔵		
	I	II	III	I	II	III
製剤 1: シュクロースと共にアルギニン・リン酸及び Tween 20 を含有	100	n. d.	1.7	>99	n. d.	1.6
製剤 4: シュクロースを含有するが、アルギニン・リン酸及び Tween 20 を含有せず	98.3	1.6	6.1	96.0	4.3	9.5

表 4 b

50℃にて貯蔵

	50℃にて4週間貯蔵			50℃にて13週間貯蔵		
	I	II	III	I	II	III
製剤1:シュクロースと共にアルギニン・リン酸及び Tween 20 を含有	100	n. d.	2.0	>99	n. d.	2.0
製剤4:シュクロースを含有するが、アルギニン・リン酸及び Tween 20 を含有せず	96.0	4.2	8.5	89.8	10.1	10.9

脚注

I OD 280により測定した蛋白質含量 (%)

II SE-HPLCにより測定した凝集 (%)、再構成された溶液の濁り(濁りユニット)(無次元数)

III 再構成された溶液の濁り(濁りユニット)(無次元数)

実施例 4

製剤のアミノ酸含有の多様性。塩基性アミノ酸、中性アミノ酸及び酸性アミノ酸を含む製剤は安定である。

製剤の組成

MAB HBV	2.0mg
リン酸緩衝剤	15mM
塩化ナトリウム	30mM
シュクロース	35～70mg
アミノ酸	種々
リン酸又はNaOH	pH6.5に調整
Tween 20	0.1mg
注射用水	1.0mlに調整

表 5

	アミノ酸
製剤 1	アルギニン (塩基性)
製剤 5	オルニチン (塩基性)
製剤 6	ロイシン (中性)
製剤 7	アスパラギン酸 (酸性)

pH値はリン酸又は水酸化物溶液により調整する。

表 6 a ~ d

4週間及び13週間の貯蔵の後の製剤 1, 5, 6 及び 7 の実験結果。

表 6 a

製剤 1 (アルギニン)

	貯蔵期間 4 週間		貯蔵期間 13 週間	
	25℃	50℃	25℃	50℃
蛋白質含量 (%) (OD 280)	100	>99	100	>99
凝集 (%) (SE-HPLC)	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
濁り	1.7	2.0	1.6	2.0

表 6 b

製剤 5 (オルニチン)

	貯蔵期間 4 週間		貯蔵期間 13 週間	
	25℃	50℃	25℃	50℃
蛋白質含量 (%) (OD 280)	>99	>98	>98	>98
凝集 % (SE-HPLC)	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
濁り	1.9	1.9	2.0	2.1

表 6 c

製剤 6 (ロイシン)

	貯蔵期間 4 週間		貯蔵期間 13 週間	
	25℃	50℃	25℃	50℃
蛋白質含量(%) (OD 280)	>98	>98	>98	>98
凝集 % (SE-HPLC)	n. d.	n. d.	0.1	0.1
濁り	2.2	2.4	2.8	2.7

表 6 d

製剤 7 (アスパラギン酸)

	貯蔵期間 4 週間		貯蔵期間 13 週間	
	25℃	50℃	25℃	50℃
蛋白質含量(%) (OD 280)	>98	>98	>98	>98
凝集 % (SE-HPLC)	n. d.	n. d.	0.1	0.1
濁り	2.7	2.7	3.4	4.0

実施例 5

実施例 5 は、種々の pH 値での製剤 1 を含む。凍結乾燥物は実施例 2 に記載したようにして調製する。補助物質の溶液及び生成物溶液

の pH は凍結乾燥の前に 85% リン酸により調整した。

製剤

MAB HBV	2.0mg
リン酸緩衝剤	15mM
塩化ナトリウム	30mM
シュークロース	68mg
アルギニン	10mg
リン酸	pH5;6.5;8 に調整
Tween 20	0.1mg
注射用水	1.0ml に調整

凍結乾燥物は表 7 に示す pH 値をもって調製した。

注射ビンにフランジを付した後、それらを光の不存在下、規定された温度条件下で貯蔵した。4週間及び13週間の貯蔵の後、サンプルを分析した（蛋白質含量はOD 280により%として、凝集はSE-HPLCにより%として、濁り）。製剤はすべてのpH値において安定であった。

表 7

	pH
製剤 8	5
製剤 9 (1 と同じ)	6.5
製剤 10	8

表 8 a

25℃にて貯蔵

	25℃にて4週間貯蔵			25℃にて13週間貯蔵		
	I	II	III	I	II	III
製剤 8	100	n. d.	1.9	>99	n. d.	2.3
製剤 9 (= 1)	100	n. d.	1.7	100	n. d.	1.6
製剤 10	>99	n. d.	2.3	>99	n. d.	2.6

表 8 b

50℃にて貯蔵

	50℃にて4週間貯蔵			50℃にて13週間貯蔵		
	I	II	III	I	II	III
製剤 8	>99	n. d.	2.2	>99	n. d.	2.3
製剤 9 (= 1)	>99	n. d.	2.0	>99	n. d.	2.0
製剤 10	>98	n. d.	2.5	>98	n. d.	2.6

脚注

I OD 280により測定した蛋白質含量 (%)

II SE-HPLCにより測定した凝集 (%)

III 再構成された溶液の濁り(濁りユニット)(無次元数)

実施例6

Tween 20の代りに界面活性剤Pluronic F 68を含有する下記の製剤を前記のようにして調製した。

貯蔵及び安定性の試験は他の実施例と同様にして行った。

製剤11

MAB HBV	2.0mg
リン酸緩衝剤	15mM
塩化ナトリウム	30mM
シュークロース	48.0mg
アルギニン	10.0mg
リン酸	pH6.5に調整
Pluronic F 68	0.1mg
注射用水	1.0mlに調整

Pluronic F 68の代りにTween 20を含有する点を除き実施例11と同じである製剤1を比較のために選択する。両方の製剤が安定であった。

表9

界面活性剤Pluronic F 68又はTween 20を含有する製剤の安定性データ

	製剤11				製剤1			
	貯蔵期間				貯蔵期間			
	4週間		13週間		4週間		13週間	
	25℃	50℃	25℃	50℃	25℃	50℃	25℃	50℃
蛋白質含量 (%) (OD 280)	>98	>98	>98	>98	100	>99	100	>99
凝集(%) (SE-HPLC)	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
濁り	1.9	1.9	2.5	2.2	1.7	2.0	1.6	2.0

実施例7

この実施例に記載する製剤12は、ビルダーとしてシュークロースの代りにマン

ニトールが使用されている点を除き、本質的に製剤1に対応する。マンニトール製剤は不安定であることがわかる。

製剤12

MAB HBV	2.0mg
リン酸緩衝剤	15mM
塩化ナトリウム	30mM
マンニトール	25.0mg
アルギニン	10.0mg
リン酸	pH6.5に調整
Tween 20	0.1mg
注射用水	1.0mlに調整

表10

ビルダーとしてマンニトール（製剤12）又はシュクロース（製剤1）を含有する製剤の安定性データ

	製剤12				製剤1			
	貯蔵期間				貯蔵期間			
	4週間		13週間		4週間		13週間	
	25℃	50℃	25℃	50℃	25℃	50℃	25℃	50℃
蛋白質含量 (%) (OD 280)	96.2	91.8	94.0	84.5	100	>99	100	>99
凝集(%) (SE-HPLC)	3.6	8.4	5.8	15.9	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
濁り	3.2	6.9	4.9	13.2	1.7	2.0	1.6	2.0

実施例8

糖、アミノ酸及び界面活性剤の組合せの必要性の更なる証明を、リストされたすべての成分を含有する製剤1と、抗体、リン酸緩衝剤、塩化ナトリウム及びアルギニンホスフェートから構成された製剤13との比較により提供する。糖及び界面活性剤がなければ凝集の生成が増加し、そして濁り値が悪化する。

製剤13

MAB HBV	2.0mg
リン酸緩衝剤	15mM
塩化ナトリウム	30mM
アルギニン	35.0mg
リン酸	pH6.5に調整
注射用水	1.0mlに調整

表11

製剤13（アルギニンホスフェートのみを含有し、シュークロース及びTween 20を含有しない）及び製剤1の安定性データ

	製剤13				製剤1			
	貯蔵期間				貯蔵期間			
	4週間		13週間		4週間		13週間	
	25℃	50℃	25℃	50℃	25℃	50℃	25℃	50℃
蛋白質含量 (%) (OD 280)	97.6	94.9	95.8	89.0	100	>99	100	>99
凝集(%) (SE-HPLC)	2.6	4.5	4.0	10.7	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
濁り	2.9	4.5	3.8	12.3	1.7	2.0	1.6	2.0

実施例9

界面活性剤（Tween 20）を使用せず、シュークロース及びアルギニンのみで安定な製剤が得られるが、濁り値は悪い（製剤14）。

製剤14

MAB HBV	2.0mg
リン酸緩衝剤	15mM
塩化ナトリウム	30mM
シュークロース	68.0mg
アルギニン	10.0mg
リン酸	pH6.5に調整
注射用水	1.0mlに調整

表12

製剤14及び製剤1の安定性データ

	製剤14				製剤1			
	貯蔵期間				貯蔵期間			
	4週間		13週間		4週間		13週間	
	25℃	50℃	25℃	50℃	25℃	50℃	25℃	50℃
蛋白質含量 (%) (OD: 280)	>99	>98	>98	>98	100	>99	100	>99
凝集(%) (SE-HPLC)	0.2	0.3	0.5	1.3	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
濁り	3.4	4.8	8.8	13.3	1.7	2.0	1.6	2.0

実施例10

下記の表は製剤15の組成を示す。使用された抗体は抗-L-セ렉チンである。
。安定性試験について表13aに示すデータは、使用された製剤が適切な安定化を可能にすることを示す。

製剤15の組成

	製剤15
アンチ-L-セ렉チン	7.0mg
リン酸緩衝剤	15mM
塩化ナトリウム	30mM
シュークロース	68.0mg
アルギニン	10.0mg
リン酸	pH 6.5に調整
Tween 20	0.1mg
注射用水	1.0mlに調整

表13a

25℃における製剤15の安定性データ

	25℃にて4週間貯蔵			25℃にて13週間貯蔵		
	I	II	III	I	II	III
製剤15: 7mg/1ml	>99	n. d.	2.5	>99	n. d.	2.9

表13b

50℃における製剤15の安定性データ

	50℃にて4週間貯蔵			50℃にて13週間貯蔵		
	I	II	III	I	II	III
製剤15: 7mg/1ml	99	n. d.	4.1	99	n. d.	5.2

I OD 280により測定した蛋白質含量 (%)

II SE-HPLCにより測定した凝集 (%)

III 再構成された溶液の濁り(濁りユニット)(無次元数)

実施例11

抗L-NGFR抗体(抗-L-神経成長因子受容体抗体)の安定性。

製剤16

下記の組成(製剤1に類似)の凍結乾燥物を調製する。

	製剤16
抗-L-NGFR	0.25mg
リン酸緩衝剤	15mM
シュークロース	75mg
アルギニン	10mg
リン酸	pH 6.5に調整
Tween 20	0.1mg
注射用水	1.0mlに調整

MAB-HBV及び抗-L-セレクチンの凍結乾燥物の調製と同様にして、抗-L-NGF
Rの凍結乾燥物を調製する。

添加剤である糖、アミノ酸及び界面活性剤を含有するpH 5～8の水溶液を、リ

ン酸緩衝液中抗-NGFRの溶液と混合する。あらかじめ規定された濃度が得られるようにリン酸塩を添加する。次に、これを濾過除菌し、そしてこうして得られた溶液を凍結乾燥する。凍結乾燥の後、光学的に完全な凍結乾燥ケーキを得る。抗-L-NGFR抗体は安定なままである。注射用水による凍結乾燥物の再構成の後、透明な溶液が得られる。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern: 2/ Application No
PCT/EP 97/06452

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 A61K39/395 A61K47/18 A61K47/26		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of database and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 97 04801 A (GENENTECH INC.) 13 February 1997 see page 18, line 35 - page 32 ---	1-3,5-11
A	WO 89 11297 A (CENTOCOR INC) 30 November 1989 cited in the application see claims 1-21 ---	1-11
A	EP 0 597 101 A (HAGIWARA, HIDEAKI) 18 May 1994 see the whole document & WO 93 01835 A cited in the application ---	1-11
A	EP 0 682 944 A (SANOFI) 22 November 1995 see claims 1-10 see page 4, line 1 - line 13 ---	1-11
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 7 April 1998		Date of mailing of the international search report 30.06.98
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Siatou, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern: Application No
PCT/EP 97/06452

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 413 188 A (BIOTEST PHARMA GMBH) 20 February 1991 cited in the application see claims 1-22 ---	1-11
A	WO 84 00890 A (BAXTER TRAVENOL LABORATORIES) 15 March 1984 cited in the application see claims 1-35 ---	1-11
A	WO 93 05799 A (FARMITALIA CARLO ERBA S.R.L.) 1 April 1993 see claims 1-12 -----	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern: al Application No

PCT/EP 97/06452

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9704801 A	13-02-97	AU 6599296 A	26-02-97
		AU 6638196 A	26-02-97
		WO 9704807 A	13-02-97
WO 8911297 A	30-11-89	DE 68908175 T	03-03-94
		EP 0417193 A	20-03-91
		JP 3504605 T	09-10-91
EP 597101 A	18-05-94	JP 5025058 A	02-02-93
		AU 662010 B	17-08-95
		AU 2330592 A	23-02-93
		WO 9301835 A	04-02-93
EP 682944 A	22-11-95	FR 2719479 A	10-11-95
		AU 1777495 A	16-11-95
		CA 2148537 A	05-11-95
		CN 1116522 A	14-02-96
		CZ 9501081 A	14-02-96
		FI 952119 A	05-11-95
		HU 72325 A	29-04-96
		JP 8053361 A	27-02-96
		NO 951724 A	06-11-95
		NZ 272045 A	27-02-96
		PL 308416 A	13-11-95
EP 413188 A	20-02-91	DE 3927111 A	21-02-91
		AT 117900 T	15-02-95
		DE 59008404 D	16-03-95
		ES 2067600 T	01-04-95
		JP 3204822 A	06-09-91
		US 5410025 A	25-04-95
WO 8400890 A	15-03-84	US 4439421 A	27-03-84
		CA 1219211 A	17-03-87
		CA 1231895 C	26-01-88
		DE 3382419 A	31-10-91
		EP 0118462 A	19-09-84
		JP 7116058 B	13-12-95
		JP 59501547 T	30-08-84

Information on paternal family members

PCT/EP 97/06452

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9305799 A	01-04-93	NONE	

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, UN, YU, ZW

(72)発明者 クレッセン, クリスチャン
ドイツ連邦共和国, デー—67742 ラウテ
レッケン, ハウプトシュトラーセ 26

(72)発明者 ボーク, ハインリッヒ
ドイツ連邦共和国, デー—69514 ラウデ
ンバッハ, リンデンシュトラーセ 6

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.